



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS RNAs PEQUEÑOS
PRODUCIDOS DURANTE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y SU
PAPEL EN LA DEFENSA ANTIVIRAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

PAULA VICTORIA RUBIO ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por SEP-CONACYT # 153639 y con un donativo de DEGAP #IN211411-3.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Susana López Charretón por todas sus enseñanzas, su tiempo, y los conocimientos que me transmitió durante la maestría, además de su esfuerzo en ayudarme a fomentar el interés en descubrir, comprender, analizar y proponer nuevas ideas frente a una investigación.

A mis tutores José Luis Reyes y Leonor Pérez, a mis sinodales Mario Zurita, Ramón González, Juan Miranda, Gustavo Pedraza y Lorenzo Segovia por sus revisiones y comentarios.

A mis papás Victoria y José Luis por todo su amor, cariño, apoyo, motivación y comprensión que me han dado para cumplir mis metas. A mi hermana Ady que sin ella mi vida no sería la misma, gracias por hacerme tan feliz y por quererme.

A mis compañeros de laboratorio y especialmente a los técnicos Pedrito y Rafa que me enseñaron mucho y me apoyaron en todo lo que necesité.

A la unidad de secuenciación masiva del IBT dirigida por Ricardo Grande y a los miembros de la unidad de bioinformática Alejandro Sánchez y Verónica Jiménez.

A la UNAM por brindarme mi formación académica y la oportunidad de tener una educación de buena calidad.

ÍNDICE

RESUMEN.	6
1. INTRODUCCIÓN.	7
1.1 Ciclo Replicativo de Rotavirus.	7
1.2 Respuesta Inmune Innata durante las infecciones virales.	9
1.3 La vía del RNA de interferencia (RNAi).	16
1.4 Inmunidad antiviral regulada por el RNAi.	17
2. ANTECEDENTES.	23
2.1 Determinación de la presencia de dsRNA en células infectadas con rotavirus.	23
2.2 Identificación de RNAs pequeños en células infectadas con rotavirus.	24
2.3 Estudio y caracterización de RNAs pequeños virales en mamíferos.	25
3. HIPÓTESIS.	27
4. OBJETIVOS.	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
6. RESULTADOS.	36
6.1. Caracterización del papel antiviral de Dicer durante la infección por rotavirus.	36
6.2. Caracterización de la localización y presencia de la proteína Dicer durante la infección por rotavirus.	37
6.3. Identificación de los RNAs pequeños presentes en las células infectadas con rotavirus.	40
6.4. Determinación de la identidad y posible origen de los RNAs pequeños producidos durante la infección.	40
6.5. Análisis de cobertura de los RNAs pequeños virales.	45
6.6. Dinámica de la producción de los RNAs pequeños virales.	52
6.7. Caracterización de la participación de Dicer en la generación de los RNAs pequeños virales.	54
6.8. Caracterización de microRNAs celulares durante la infección por rotavirus.	57

6.9. Estudio de expresión diferencial de microRNAs celulares durante la infección por rotavirus.	59
7. DISCUSIÓN.	62
8. CONCLUSIONES.	66
9. REFERENCIAS.	67

Resumen

Los rotavirus representan el principal agente causante de gastroenteritis severas en niños. Al infectar a las células, los rotavirus desencadenan un serie de respuestas antivirales para contrarrestar la infección. La vía del RNA de interferencia (RNAi) es un proceso de regulación post-transcripcional que participa en diferentes procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación, apoptosis pero también se ha caracterizado que esta vía representa uno de los mecanismos de respuesta inmune innata contra las infecciones virales en plantas, moscas y gusanos. Sin embargo la participación de esta vía en la defensa antiviral en mamíferos apenas se está elucidando. La manera en la que el RNAi funciona como mecanismo de respuesta antiviral en plantas e invertebrados es a través de producir RNAs pequeños derivados de los virus vsRNAs (virus derived small RNAs) que se asocian a componentes efectores de la vía que se encargan del silenciamiento de las secuencias complementarias a los vsRNAs.

En el presente trabajo se hizo el silenciamiento de la proteína Dicer, la cual es un componente de la vía del RNAi, y se encontró que en las células que tienen niveles bajos de la proteína la infectividad y el rendimiento viral aumentan. Lo cual sugiere que esta proteína tiene una contribución en la respuesta antiviral. Adicionalmente también se caracterizó la población de RNAs pequeños (21-25 bases) presente en células infectadas con rotavirus. Por medio de análisis de secuenciación masiva, se corroboró que la mitad de los RNAs pequeños que se producen en células MA104 infectadas con rotavirus provienen del genoma viral. Los once segmentos de RNA que componen el genoma de rotavirus, están representados en las secuencias de RNAs pequeños identificadas. Además encontramos que la producción de la mayoría de estas secuencias de RNAs pequeños virales son productos del corte con la proteína Dicer. Los datos obtenidos del presente trabajo muestran que la vía del RNAi tiene una contribución en la defensa contra el virus en células de mamífero infectadas con rotavirus.

1. INTRODUCCIÓN

Los rotavirus son considerados los principales agentes causantes de diarreas deshidratantes en niños debido a que infectan los enterocitos de las vellosidades del intestino delgado provocando cerca de medio millón de muertes al año [46]. Son virus que pertenecen a la familia *Reoviridae*, no poseen envoltura lipídica, y su diámetro es de aproximadamente 100 nm. La partícula viral madura está formada por tres capas proteicas a la cual se le conoce como partícula de triple capa o TLP (Three Layered Particle) por sus siglas en inglés (Fig. 1.1A). La capa externa del virión está compuesta por dos proteínas estructurales, las cuales son la glicoproteína VP7 y la proteína VP4 que forma proyecciones tipo espículas (Fig. 1A) [56,65]. La proteína VP4 tiene la función de unirse a receptores y se ha propuesto que facilita la penetración de membranas durante la entrada del virus [3,64]. Las espículas triméricas de VP4 están ancladas en depresiones dentro de la capa intermedia de la partícula viral formada por trímeros de VP6, la cual es la proteína más abundante de la partícula viral [56,65]. VP6 se localiza por encima de la proteína VP2 que forma la capa interna del virión. En el “core” formado por la proteína VP2 se encuentra empaquetado el genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dcRNA). Cada segmento tiene asociado a una RNA polimerasa (VP1) y la guanilil-transferasa (VP3). De las proteínas virales codificadas en el genoma de rotavirus, 6 son estructurales (VP1-VP4, VP6-VP7) y seis no estructurales NSP1-NSP6 [24,34]. Cada segmento codifica para una sola proteína, excepto el segmento 11 que codifica para dos proteínas no estructurales (NSP5-NSP6) (Fig. 1B).

1.1. Ciclo replicativo de Rotavirus.

El principal blanco de infección de los rotavirus son los enterocitos maduros del intestino delgado. Para que ocurra la infección de las células, la proteína VP4 localizada en la superficie del virión es cortada por proteasas (tripsina) que se encuentran en el lumen intestinal, formando las proteínas VP5 y VP8, las cuales pueden interactuar con los receptores celulares permitiendo la entrada del virus a la célula [3]. Cuando los rotavirus

entran a la célula pierden la capa proteica más externa, formándose partículas de dos capas denominadas DLPs (Double Layer Particle).

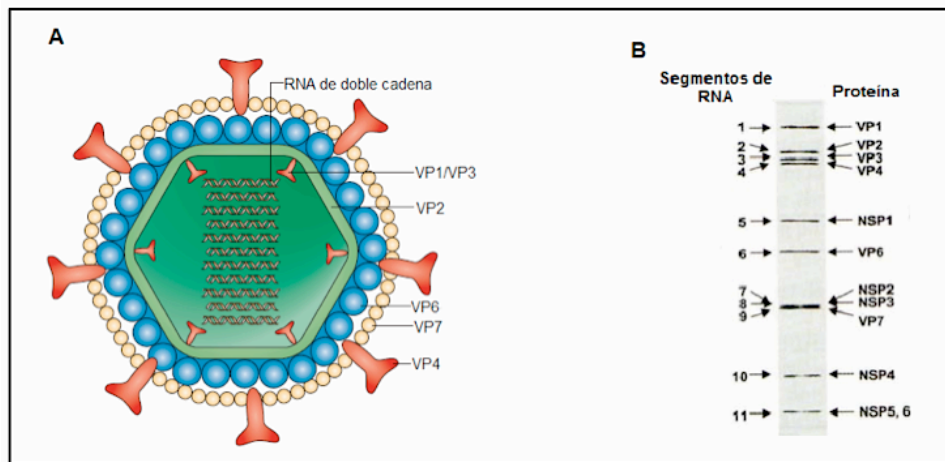


Figura 1. Estructura de los rotavirus. (A). Esquema de la organización del virión maduro. En la imagen se muestran las proteínas estructurales por las cuales está formada la partícula viral. (B). Electroforesis en gel de poliacrilamida de los 11 segmentos de RNA que componen el genoma de rotavirus, para cada segmento se muestra la proteína que codifica cada uno. (Tomado y modificado de Angel *et al.* Nature Reviews, 2007).

Las DLPs son transcripcionalmente activas. Dentro de las DLPs la RNA polimerasa VP1 empieza a transcribir y producir RNAs de polaridad positiva (RNA+) usando como templado el RNA de polaridad negativa (RNA-) [34,64]. Los nuevos transcritos de RNA+ se liberan de la partícula acumulándose en el citoplasma. Los RNA+ tienen dos funciones esenciales, por una parte funcionan como RNAs mensajeros que se asocian a los ribosomas celulares dirigiendo la síntesis de las proteínas virales. Otros RNAs+ se asocian a los viroplasmos formados por las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 para servir como molde para la síntesis de la hebra negativa y por lo tanto ocurre la replicación del genoma [34,39] (Fig. 1.1). Concomitantemente a la replicación del genoma, éste es empaquetado dentro del core de VP2. Posteriormente adquieren la capa intermedia (VP6) dando lugar a la formación de nuevas partículas de doble capa. Las DLPs recién formadas se dirigen al lumen del retículo endoplásmico donde adquieren las proteínas de la capa externa VP4 y VP7 para dar lugar a la formación de nuevos virus maduros infecciosos [64].

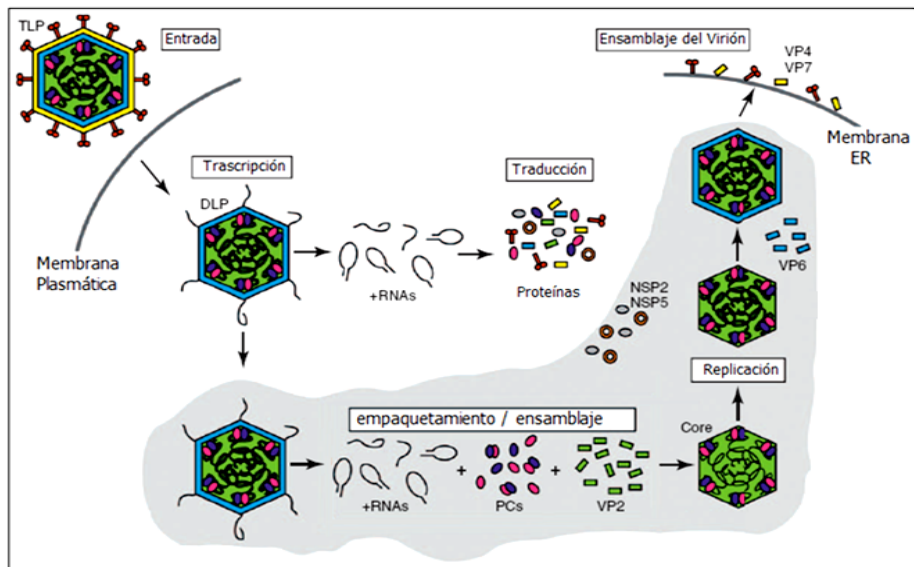


Figura 1.1. Ciclo replicativo de los rotavirus. Las partículas virales de tres capas (TLPs) interactúan con receptores que se encuentran en la membrana plasmática y el virus entra a la célula. Durante la entrada los virus pierden la capa más externa generando partículas de dos capas (DLPs). Las DLPs inician la transcripción produciendo RNAs de polaridad positiva, los cuales se liberan al citoplasma donde se traducen y se forman las proteínas virales. En los viroplasmos formados por las proteínas virales NSP2 y NSP5 (gris) se encuentran los complejos de polimerasa (PCs) formados por VP1 y VP3 que se asocian a VP2 formando los “cores” donde ocurre la replicación del genoma usando los RNA+ como templado para la síntesis de la hebra negativa. Posteriormente se ensambla la proteína VP6 formando nuevas DLPs. Las DLPs se dirigen al retículo endoplásmico donde adquieren las proteínas externas VP7 y VP4 formando nuevos viriones maduros que se liberan por lisis celular. (Tomado y modificado de MacDonald y Patton, Trends in Microbiology, 2010).

1.2. Respuesta Inmune Innata durante las infecciones virales.

El sistema inmune innato se encarga de establecer una respuesta inmediata al contacto de la célula con patógenos utilizando mecanismos que se han conservado evolutivamente entre los eucariontes [69]. En los vertebrados la defensa inmune innata durante las infecciones virales depende principalmente del sistema de interferones, a diferencia de las plantas y algunos invertebrados que utilizan la maquinaria del RNA de interferencia (RNAi) como principal sistema de defensa (Fig. 1.2). Cuando un virus infecta a la célula lo primero que ocurre es la detección de los patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a los patógenos PRRs (pattern-recognition receptors) [1,12]. Los receptores PRRs se caracterizan principalmente por tener dos dominios funcionales, uno que interactúa directamente con las moléculas del patógeno, y el otro que se une a proteínas que se encargan de activar diferentes vías de señalización y promover la expresión de genes

implicados en establecer el estado antiviral. Las familias más estudiadas de estos receptores son los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico RIG (RLRs) y los receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido NOD (NLRs) [16]. Los receptores TLRs y los RLRs inducen la producción de los interferones tipo I y varias citosinas, mientras que los NLRs regulan la maduración de interleucinas 1- β (IL-1 β) por medio de la activación de caspasas-1 [69].

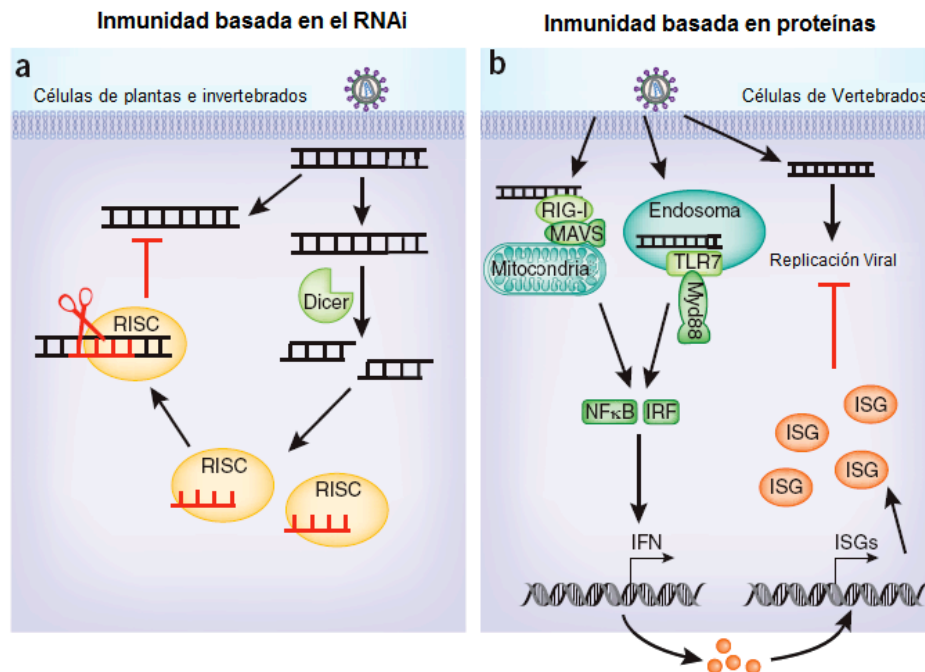


Figura 1.2. Mecanismos de inmunidad innata. a) En invertebrados y plantas la inmunidad basada en el RNAi es el principal mecanismo de defensa contra las infecciones virales. Cuando el virus infecta a la célula el RNA viral es procesado por Dicer en RNAs pequeños que se asocian a los complejos inductores de silenciamiento de RNA (RISC), los cuales se unen a secuencias virales induciéndose su degradación **b)** En los mamíferos existen receptores como el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) y los receptores tipo toll (TLR) que se unen al RNA viral para activar factores de transcripción como NF κ B y los factores regulatorios de interferón (IRF) que promueven la expresión de los interferones (IFN) que a su vez se encargarán de promover la transcripción de genes estimulados por interferones (ISG) que son proteínas que tienen la finalidad de reprimir la replicación viral. (Tomado y modificado de Yan y J. Chen, Nature Immunology, 2012).

Durante las infecciones virales, existe RNA de doble cadena (dcRNA) en el citoplasma de las células infectadas, que es reconocido por PRRs [16]. Algunos virus con genoma de dcRNA activan la respuesta antiviral con su propio material genético. Otra población de dcRNA que puede estar presente durante las infecciones virales son los intermediarios de replicación, que se forman cuando los virus de RNA se están replicando. [12].

La detección de el material genético viral por los RLRs y los TLRs activan cascadas de señalización que culminaran en la producción de interferones (IFNs), citocinas proinflamatorias, y moléculas como CD40, CD80 y CD86. Una de los mecanismo más caracterizados de la respuesta inmune contra los virus es a través del uso de los interferones. Existen tres tipos de interferones, los interferones tipo I a III. Los interferones alfa ($IFN\alpha$) y beta ($IFN\beta$) pertenecen a los interferones de tipo I, el interferón gama ($IFN\gamma$) es el único interferón de los del tipo II y el interferón lambda ($IFN\lambda$) es el único miembro de los interferones tipo III. [35]. Los interferones tipo I se unen a los receptores de interferones (IFNAR), estos receptores están asociados a cinasas (JAK y TYK2). Al ocurrir la unión del interferón al receptor la cinasas fosforilan a los complejos STAT (signal transducer and activator factor) que fosforilados se translocan al núcleo para promover la transcripción de genes estimulados por interferón (ISGs) (Figura 1.2.1). Algunos de los ISGs codifican para receptores reconocedores de patógenos PRRs, mientras que otros ISGs codifican para proteínas con actividad antiviral como las proteínas de mixoma (Mx), la RNasaL, la proteína cinasa R (PKR), las proteínas transmembranales inducidas por interferón (IFTMs), y la deaminasa de adenosina RNA específica (ADAR) [27,35].

La PKR es una cinasa compuesta por dos dominios de unión al dsRNA en el amino terminal y un dominio de cinasa en el carboxilo terminal. PKR tiene la capacidad de unirse al dsRNA y al RNA de cadena sencilla [52]. Cuando PKR se une al dsRNA, fosforila a la subunidad α del factor de iniciación de la traducción 2 ($eIF2\alpha$) en la serina 51. En las células de los mamífero el complejo $eIF2$ -GTP se encarga de llevar el Met-tRNA a la subunidad 40 del ribosoma. En este proceso se hidroliza el GTP, se libera $eIF2$ -GDP y se regenera $eIF2$ -GTP por medio del factor intercambiador de GTP $eIF2B$. Cuando el factor $eIF2\alpha$ esta fosforilado se asocia con gran afinidad al factor $eIF2B$ lo que previene que ocurra el intercambio de GDP por GTP y por lo tanto se inhibe el inicio de la traducción [52,16] (Fig. 1.2.2).

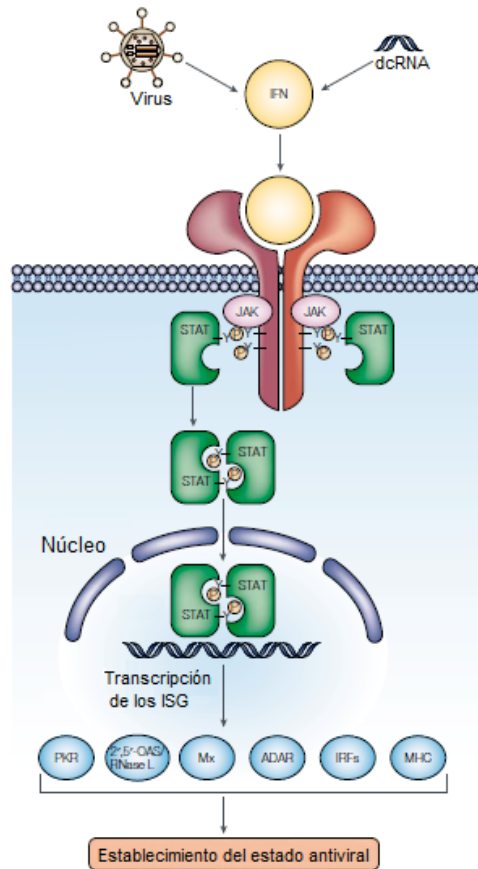


Figura 1.2.1. Vía de señalización de los interferones. Los interferones tipo I (IFN) se producen ante una infección viral. Los IFNs ejercen su actividad a través de unirse a receptores celulares específicos. Al unirse a su receptor se activa la vía de STAT y JAK, lo que produce la expresión de los genes estimulados por interferón (ISGs). Algunos ISGs son PKR, OAS RNasa L, ADAR las cuales son proteínas que participan en el establecimiento del estado antiviral de la célula. Tomado y modificado de Katze, *et al.* Nat Rev Immunol. 2002.

EL sistema 2'-5' oligoadenilato sintetasa (OAS)/RNasaL es una vía que puede activarse en respuesta a las infecciones virales. OAS comprende a una familia de 8 a 10 isoformas codificadas por tres genes (OAS1 a OAS3). Cuando se une el dsRNA 2'-5' OAS polimeriza ATP formando los 2'-5' oligoadenilatos (2-5A). En ausencia de los 2-5A la RNasaL está inactiva en forma monomérica. Cuando se une a los 2-5A se inducen cambios conformacionales que ocasionan la dimerización y activación de su dominio de endorribonucleasa, degradando los RNAs de cadena sencilla [16,58] (Fig. 1.2.2). La RNasaL corta principalmente en el sitio 3' de los RNAs de cadena sencilla y tiene la capacidad de degradar los RNAs virales y celulares ya que se ha caracterizado el corte de ambos tipos de RNAs en condiciones donde se producen altos niveles de 2-5A [58].

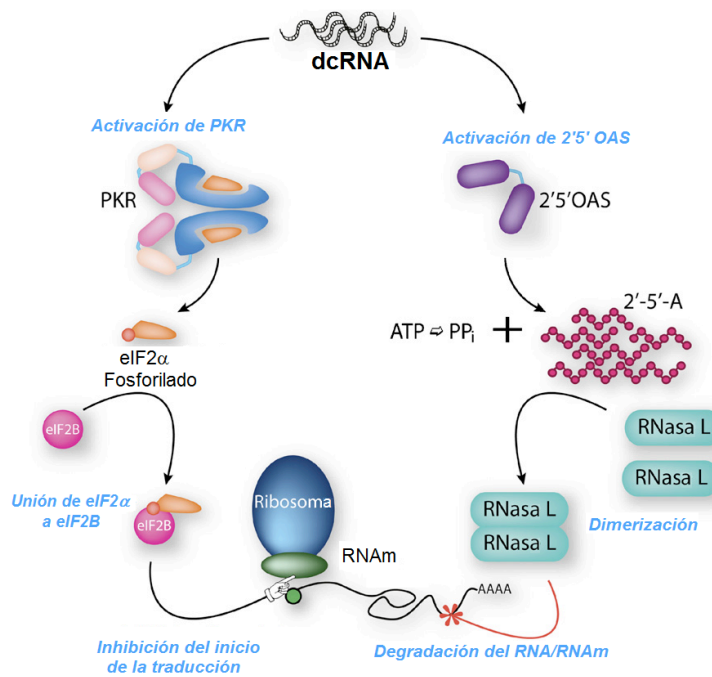


Figura 1.2.2. El RNA de doble cadena activa mecanismos para reprimir la infección viral. El RNA de doble activa a PKR que fosforila a eIF2 α , lo que produce que se secuestre al factor de inicio eIF2B y no ocurra el recambio de GDP por GTP, por lo tanto se inhibe el inicio de la traducción. La activación de 2'5' OAS promueve la formación de los 2-5' oligoadenilatos que causan la dimerización y activación de la RNasa L que degrada RNAs de cadena sencilla. Tomado de Garinier *et al.* Cytokine & Growth Factor Reviews, 2007.

El gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-I) y el gen-5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA5), son receptores localizados en el citoplasma que reconocen y se unen al dsRNA viral. RIG-I y MDA5 tienen un dominio de helicasa DExD/H y dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) [16]. Cuando el dsRNA se une a RIG-I o MDA5, es desenrollado por el dominio de helicasa produciendo un cambio conformacional en las proteínas que permite la exposición de los dominios de unión a CARDS [69]. Los dominios CARD son ubiquitinados por la E3 ubiquitina ligasa TRIM25. Los CARD ubiquitinados interactúan con las MAVS (señal antiviral de mitocondria), las cuales se encuentran en la membrana externa de la mitocondria. La interacción de los CARDS con MAVS promueve que las MAVS se agreguen en la membrana mitocondrial, lo que produce el reclutamiento de proteínas señalizadoras que están en el citoplasma y que llevan a cabo la activación de IKK y de la ligasa tipo IKK denominada TBK1. TBK1 tiene la capacidad de fosforilar a factores regulatorios de interferón (IRFs) como IRF3 y IRF7 [69]. Cuando IRF3 y IRF7 son fosforilados, se translocan al núcleo y en conjunto con

NF κ B inducen la producción de IFN- β y otras moléculas como las citocinas proinflamatorias [16] (Fig. 1.2).

Los receptores tipo Toll (TLRs) son una familia de proteínas que reconocen el RNA viral. TLR3, TLR7 y TLR9 son receptores que se encuentran en los compartimientos endosomales. TLR7 se une al RNA de cadena sencilla y TLR3 al RNA de doble cadena [16]. Todos los TLRs excepto TLR3 activan la ruta de señalización para producir citosinas proinflamatorias a través del factor 88 de diferenciación mieloide (MYD88). Cuando los TLRs se unen al RNA reclutan por medio de su dominio TIR (Toll/IL receptor) a la proteína MYD88. MyD88 recluta a la cinasas IRAK (interleukin R-associated kinasa) que cuando se fosforilan se asocian con TRAF6 (TNF receptor associated factor 6). TRAF6 activado cataliza la formación de una cadena de poliubiquitina en IKK- γ / NF- κ B. TRAF6 también activa a TAK1 (cinasa 1 del factor transformante de crecimiento TGF- β) la cual fosforila a IKK-b y la MAPK cinasa 6 que modula la activación de NF- κ B y MAPKs, lo que resulta en la inducción de genes implicados en las respuestas inflamatorias [69].

En el citoplasma de las células existe una proteína llamada Dicer que tiene como sustrato al dsRNA. Dicer interactúa con el dsRNA, cortándolo y produciendo RNAs pequeños que tienen un tamaño característico de entre 21-25 bases. Debido a esta capacidad de reconocimiento y corte del RNA, Dicer también es considerada como un receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos [1].

La proteína Dicer es una endoribonucleasa perteneciente a la familia de RNasas tipo III, las cuales tienen la capacidad de cortar dsRNAs o RNAs de cadena sencilla que estén estructurados formando doble cadena [47]. Dicer contiene un dominio helicasa/ATPasa que se encuentra en la región N-terminal, un dominio DUF (domain of unknown function) con función desconocida hasta ahora, un dominio PAZ (Piwi Argonaut and Zwille), dos dominios de RNasa III y un dominio de unión a dsRNA [37] (Fig. 1.2.3 A). La estructura cristalográfica de Dicer ha revelado que la habilidad de esta proteína para producir los RNAs pequeños de tamaño característico es debido a un arreglo espacial del dominio PAZ y los dos dominios de RNasa III. El dominio PAZ de Dicer tiene los mismos residuos que las proteínas Argonautas. Cuando el dsRNA se une a Dicer, la porción hidrofóbica del dominio PAZ se une al extremo 3' de los sustratos de RNA y los dos

dominios de RNasa III dimerizan [2,61]. Entre el dominio PAZ y los dominios de RNasa III existe una hélice conectora, que se localiza entre el dominio PAZ y los dos dominios de RNasa III. En el sitio donde dimerizan los dominios de RNasa III se lleva a cabo el corte de las dos cadenas de RNA. Los RNAs generados con este corte tienen un tamaño característico debido a que la distancia que existe entre el dominio PAZ y el dominio de RNasa III donde se realiza el corte es de 65 Å, esta distancia corresponde aproximadamente a 25 bases [37] (Fig. 1.2.3. B). Los RNAs pequeños generados con el corte con Dicer, generalmente tienen un grupo fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' OH [2,8].

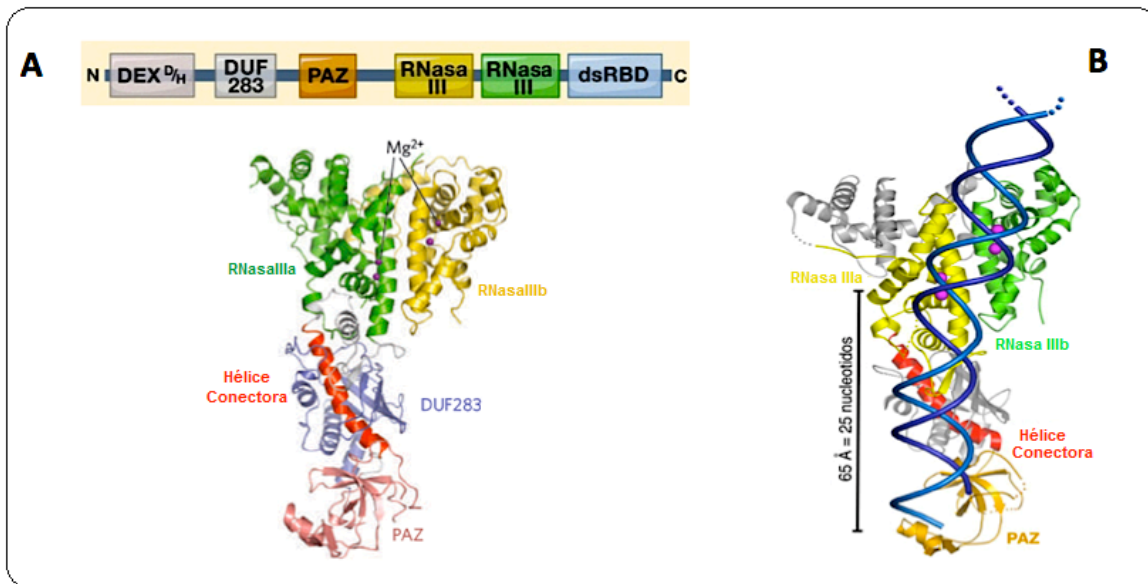


Figura 1.2.3. Estructura cristalográfica de la proteína Dicer. A. Se muestra la estructura cristalográfica de Dicer con los dominios por los cuales está constituida. B. Esquema del mecanismo de unión y corte del dsRNA por medio de la proteína Dicer. Tomado y modificado de MacRae, *et al.*, Science,2006 y Park *et al.*, Nature, 2011.

Se ha caracterizado que Dicer tiene la capacidad de cortar el dsRNA viral que se produce durante las infecciones con virus de RNA. Cuando Dicer corta el dsRNA viral se generan RNAs pequeños derivados de virus (vsRNAs) que se pueden asociar a complejos de silenciamiento de RNA de interferencia (RISC) para desencadenar una respuesta antiviral a través de la utilización de la vía del RNAi [41].

1.3. La vía del RNA de interferencia (RNAi).

En las células existen RNAs pequeños conocidos como miRNAs y siRNAs, los cuales son secuencias cortas de RNA que están formadas por 21 a 25 bases, no codifican para proteínas y tienen la capacidad de regular post-transcripcionalmente la expresión de genes [7,14,23]. Se sabe que los RNAs pequeños participan en numerosos procesos celulares tales como el desarrollo, diferenciación, proliferación celular, apoptosis y regulación de la respuesta del sistema inmune, entre otras [23].

Los microRNAs y los siRNAs comparten las mismas características bioquímicas pero la principal diferencia entre estos dos tipos de RNAs pequeños es su biogénesis [9]. Los miRNAs provienen de secuencias que están codificadas en el genoma del organismo, las cuales se transcriben en el núcleo por la RNA polimerasa II formando los pri-miRNAs que tienen estructuras tipo tallo-asa. Los pri-miRNAs son reconocidos por el complejo microprocesador (Drosha-DGSR8), que los corta en la parte basal generando los pre-miRNA [29]. Los pre-miRNAs son exportados del núcleo por la Exportina 5 (Fig. 1.3B). En el citoplasma la porción terminal del pre-miRNA es reconocida y removida por la RNasa Dicer, lo que genera una molécula de doble cadena de RNA conocida como miRNA dúplex. Una de las cadenas del miRNA dúplex se incorpora al complejo de silenciamiento de RNA de interferencia (RISC) dirigiendo al complejo a hibridar con su secuencia complementaria en el RNA mensajero blanco [23,55]. Cuando RISC encuentra una secuencia de RNA mensajero que aparea por completo con el miRNA el RNA mensajero es cortado y degradado por medio de proteínas de la familia Argonauto (AGO) que forman parte del complejo RISC [10]. Sin embargo cuando las proteínas AGO del complejo RISC aparecen con un RNA mensajero de manera parcial, se inhibe la traducción por diversos mecanismos, como el llevar a los mensajeros a los cuerpos P (P bodies), o se impide la elongación o el inicio de la traducción de los RNAs mensajeros al estar unidos al complejo RISC [7].

Los siRNAs tienen su origen a partir de RNAs exógenos que se introducen en el citoplasma. El dsRNA localizado en el citoplasma de las células es procesado por la RNasa Dicer generando secuencias dúplex de RNA conocidos como siRNAs. Los siRNAs se unen a complejos RISC para aparear con sus RNAs mensajeros induciendo su degradación. [9,23] (Fig. 1.3 A).

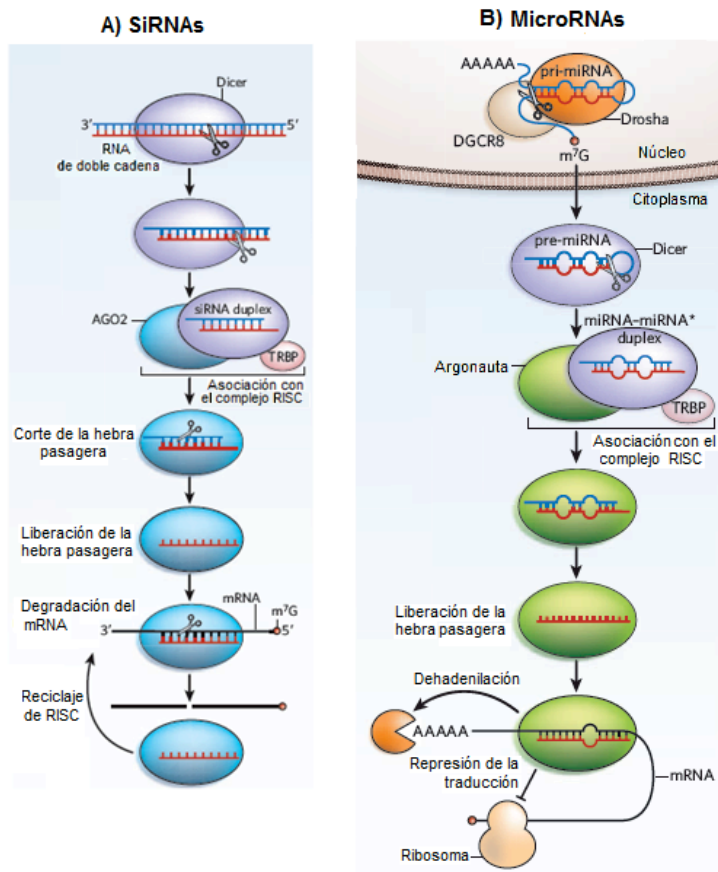


Figura 1.3. Biogénesis de los siRNAs y de los microRNAs. (A) Los siRNAs se generan a partir de dsRNAs, que pueden provenir de la replicación de virus o elementos genéticos móviles. Dicer los dcRNAs en siRNAs duplex de 21-25 nucleótidos. Después del corte con Dicer una de las hebras (hebra guía) se carga en el complejo de silenciamiento RISC, durante ese proceso la hebra pasajera se corta por la proteínas Argonautas y se liberan del complejo. La proteína Argonaua usa la secuencia RNA guía para asociarse al RNA mensajero blanco, una vez unido al mensajero se lleva a cabo su degradación. (B) Los microRNAs son secuencias codificadas en el genoma, se transcriben como transcritos primarios (pri-miRNAs) que contienen estructuras tallo-asa y miden de 65-70 nucleótidos, la estructura tallo-asa es removida por Drosha, posteriormente salen del núcleo por medio de la Exportina 5, donde son procesados por la proteína Dicer. Los microRNAs producidos se cargan en el complejo RISC. Generalmente los microRNAs de animales son parcialmente complementarios a sus secuencias blanco por lo tanto ejercen su acción principalmente por medio de la inhibición de la traducción. Tomado y modificado de Jinek y Dodna, Nature Reviews, 2009.

1.4. Inmunidad antiviral regulada por el RNAi.

Se ha propuesto que una de las formas más antiguas de la inmunidad antiviral es la regulada a través del RNA de interferencia (RNAi) [69]. Los RNA de interferencia se describieron primero en *C. elegans* en el año de 1998, cuando se inyectó RNA de doble cadena en gusanos adultos,

produciendo el silenciamiento de genes que tenían homología con las secuencias inyectadas [12]. Subsecuentemente fenómenos similares fueron descritos en *D. melanogaster* y en plantas. En todos estos casos se observó que al introducir dsRNA en el citoplasma de las células, este era procesado por la RNasa III Dicer generando RNAs pequeños dúplex de 21 nucleótidos (siRNAs) [1]. Las primeras caracterizaciones que se realizaron para estudiar el papel de la maquinaria de RNAi en la respuesta antiviral fueron hechas en *C. elegans* y en *D. melanogaster*. Se generaron mutantes en ambos organismos, que afectaran alguno de los componentes de la vía del RNAi, y se encontró que las mutaciones en la maquinaria del RNAi producía organismos aparentemente normales, sin embargo esta mutaciones incrementaban la susceptibilidad de estos animales a la infección viral [25].

En algunas infecciones causadas por virus de RNA, el dsRNA puede estar presente ya sea en forma de intermediarios de replicación, o el genoma en el caso de virus de RNA de doble cadena. Dicer corta los dsRNAs virales produciendo siRNAs virales. Los siRNAs virales se cargan en el complejo de silenciamiento RISC para unirse a sus blancos que pueden ser RNAs mensajeros virales limitando la infección viral. [13] (Figura 1.5).

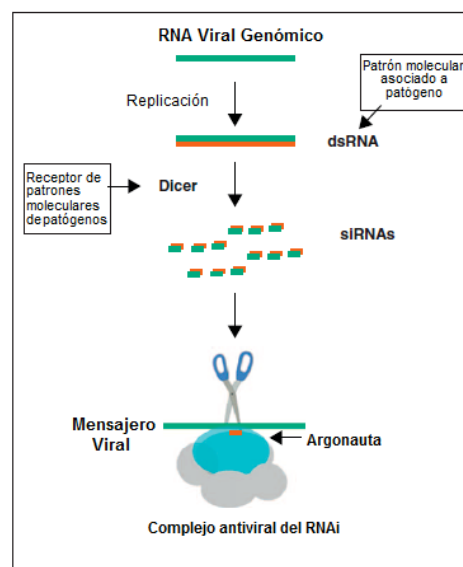


Figura 1.5. Inmunidad antiviral regulada por el RNAi. Las infecciones en hongos, plantas e insectos con virus de RNA de polaridad positiva desencadena la biogénesis de siRNAs derivados de los virus que se pueden asociar a proteínas Argonata para dirigir la eliminación de RNA viral. Tomado y modificado de Ding y Lu, Current Opinion in Virology, 2011.

Inmunidad antiviral en plantas, hongos e invertebrados regulada por el RNAi.

Durante las infecciones virales se puede inducir la producción de RNAs pequeños derivados de los virus (vsRNAs) los cuales presentan propiedades bioquímicas similares a los siRNAs, miRNAs y piRNAs [13]. El descubrimiento de los RNAs pequeños virales en el año de 1999 ocurrió cuando se infectaron plantas con el virus de la papa (PVX). En este estudio encontraron que la infección viral inducía la producción de RNAs pequeños virales que degradaban RNAs del virus a través de un mecanismo de homología entre las secuencias de RNA [12]. La infección con el virus Flock House en células de *D. melanogaster* permitió encontrar la evidencia experimental de la inducción de la maquinaria de RNAi contra la infección viral. Los RNAs pequeños derivados del virus Flock House hibridaban con oligos cuyas secuencias correspondían a diferentes regiones del genoma del virus. Adicionalmente encontraron que la disminución de RNA genómico y subgenómico del virus FHV requería de AGO2 [12]. Estudios subsecuentes han detectado RNAs pequeños provenientes de virus en hongos, plantas, mosquitos y *C. elegans* [12].

D. melanogaster codifica para dos tipos de Dicer (DCR1 y DCR2) que son necesarias para la biogénesis de los microRNA y los siRNAs respectivamente. Comparado con las moscas silvestres, las mutantes para *dcr2* presentan una mayor susceptibilidad a la infección con virus de RNA de polaridad positiva como el FHV, virus Sindbis y el virus de la parálisis de grillos [13]. En las moscas mutantes *dcr2* infectadas, se detectó una mayor cantidad de cada uno de estos virus en comparación con las silvestres, con lo que se pudo demostrar que DCR-2 tiene un papel activo en la protección contra diversos virus de RNA de polaridad positiva en *D. melanogaster* [12]. Los hongos, *Neurospora crassa* y *C. parasítica* codifican para dos proteínas Dicer. En *N. crassa* las dos proteínas Dicer tienen los mismos efectos cuando se induce su silenciamiento, sin embargo en *C. parasítica* DCR-2 la utilizada para producir los siRNAs virales [12]. En *A. thaliana* modelo de estudio muy utilizado en plantas, codifica para cuatro proteínas tipo Dicer (DCL1-4). Los microRNAs son predominantemente producidos por DCL-1, mientras que DCL-4, DCL-2 y DCL-3 producen tres tipos de siRNAs de 21, 22 y 24 bases respectivamente. La defensa de las plantas contra virus de RNA de polaridad positiva es controlada por dos proteínas DCL2 y DCL4, ya que al hacer plantas mutantes para DCL4 y DCL2, estas plantas no logran establecer una

defensa antiviral eficiente y son más susceptibles a la infección por virus de RNA de cadena positiva como el virus del tabaco y el CMV [12]. *C. elegans* es otro modelo que ha sido muy utilizado para la caracterización de la maquinaria del RNAi. *C. elegans* codifica para una sola Dicer (DCR-1), la cual se encarga de la biogénesis de miRNAs y siRNAs. En *C. elegans* la inmunidad de RNAi depende de la producción de siRNAs secundarios que requieren la síntesis de novo del RNA complementario de los RNA mensajeros blanco a través de la RNA polimerasa dependiente de RNA [1].

Los virus han desarrollado diferentes estrategias para poder inhibir la vía del RNAi favoreciendo la infección [68]. La inmunidad antiviral regulada por el RNAi se puede ver afectada en muchas especies cuando los virus codifican para proteínas que inactivan alguna de las proteínas AGO, como la AGO2 de *D. melanogaster*, AGO1 y AGO7 de *A. thaliana*, RED-1 de *C. elegans* y AGO 2 de *C. parasítica*. Estos descubrimientos indican que el corte que hacen las proteínas Dicer del material genómico viral no es suficiente por sí sólo y que se necesita de la actividad de las proteínas AGO para desencadenar una eficiente respuesta inmune antiviral en estos organismos [18].

Inmunidad antiviral en mamíferos regulada por el RNAi

Se ha propuesto que además del sistema de interferones con el que cuenta la célula para defenderse de las infecciones virales, la vía del RNAi es un mecanismo que podría participar en la respuesta antiviral en mamíferos. Existen varios reportes donde se ha caracterizado la participación de RNAs pequeños en regular la infección como es el caso de microRNAs celulares que tiene un papel activo durante las infecciones virales [18,25]. Un ejemplo muy claro de esta regulación es el mir-122, el cual es un microRNA específico que se expresa en el hígado de humanos. Varios estudios han mostrado que mir-122 contribuye activamente en favorecer la infección, ya que su presencia aumenta la replicación del virus de la hepatitis C (HCV) [57]. Otros microRNAs celulares que participan durante proceso de infección viral son el mir-323, mir-491 y mir-654 que tienen como blanco ciertas regiones del genoma del virus de Influenza, los mir-27 y mir-93 tienen como blanco al virus VSV y el mir-28, mir29a, mir-125b que tienen

como blanco ciertas regiones del virus HIV-1, todos estos microRNAs celulares tienen como finalidad inhibir la replicación del virus [53].

Algunos virus pueden codificar en su genoma microRNAs que contribuyen a que se desarrolle más eficiente su ciclo replicativo [59]. La mayoría de estos microRNAs virales identificados se han caracterizado en virus de DNA que se replican en el núcleo, ya que estos virus necesitan de la maquinaria celular para la biogénesis de sus microRNAs [11,20,59]. A la fecha se han identificado más de 200 miRNAs virales principalmente en la familia de los herpesvirus y otros virus como los ascovirus, poliomavirus, y los adenovirus (Tabla 1).

Tabla 1. Virus que codifican para microRNAs. Tomado y modificado de Grundhoff y Sullivan 2011.

Familia	Virus	Pre-miRNA	MicroRNA Maduro
α-Herpesvirus	Herpes Simple 1	16	25
	Herpes Simple 2	18	24
	Herpes B	3	3
	Herpesvirus Bovino	10	12
β-Herpesvirus	Citomegalovirus Humano	11	17
	Citomegalovirus de Ratón	18	28
γ-Herpesvirus	Epstein-Barr	25	44
	Sarcoma de Kaposi	12	25
	Herpesvirus gama de ratón	15	28
Poliomavirus	SV40	1	2
	Polimavirus de Ratón	1	2
	SA12	1	2
Ascovirus	Ascovirus Heliiothis	1	1
Adenovirus	Adenovirus humanos tipo 2	2	3

En 2004, Pfeffer y colaboradores, identificaron los primeros microRNAs expresados en células B infectadas con el virus Epstein-Barr [59]. Este virus tiene la capacidad de transformar células B en reposo en células proliferativas. Las células infectadas con este virus muestran expresión abundante de RNAs pequeños no codificantes llamados EBER1 y EBER2. La clonación exitosa de cinco microRNAs del Epstein-Barr en células B infectadas con el virus, demostró que este

virus tiene el potencial de usar la vía del RNAi para producir microRNAs que le ayudan a establecer una infección latente exitosa [42]. Además del Epstein-Barr también se han estudiado la participación de microRNAs virales en el desarrollo de la infección en virus de Sarcoma de Kaposi, herpes simple, poliomavirus y adenovirus. Estos ensayos han mostrado que los microRNAs virales están implicados en regular diferentes actividades como el establecimiento de los ciclos líticos, el favorecimiento de la replicación viral a través de promover la sobrevivencia y proliferación de las células, además de participar en modular la respuesta inmune del hospedero [10,59]. Por lo tanto en base a los estudios mencionados se ha establecido que la vía del RNAi participa en la regulación de la respuesta antiviral en mamíferos.

2. ANTECEDENTES

2. 1. Determinación de la presencia del RNA de doble cadena en células infectadas con rotavirus.

Como se ha mencionado previamente, el dsRNA es una molécula que puede desencadenar varias vías de la respuesta inmune innata. En las infecciones con virus de genoma de RNA, el dsRNA puede producirse como intermediario durante la replicación del genoma viral o ser el propio genoma como es en el caso de los virus con genoma de dsRNA. El dsRNA viral se une a receptores de las células que se encargan de activar la respuesta contra el virus.

En nuestro laboratorio en el trabajo realizado por Rojas *et al.* 2010, se reportó la presencia de dsRNA en el citoplasma de las células infectadas con rotavirus. En este trabajo se infectaron células MA104 con rotavirus RRV y se usó el anticuerpo J2 que reconoce RNA de doble cadena. Se encontró que en las células infectadas con rotavirus había señal fluorescente con el anticuerpo J2, esta señal no se detectó en células sin infectar lo cual confirmaba que el dsRNA detectado era viral (Fig. 2.1a). Una parte de la señal fluorescente del dsRNA colocalizaba con los viroplasmos (anticuerpo α -NSP5) lo que era de esperarse ya que es en estas estructuras en las que se lleva a cabo la replicación del genoma viral, pero otra parte de la señal fluorescente con el anticuerpo J2 se localizaba fuera de los viroplasmos, lo cual indicó que parte del dsRNA estaba en el citoplasma de las células (Fig. 2.1a). Para confirmar que la señal del anticuerpo J2 se debía a la presencia de RNA de doble cadena y no de RNA de cadena sencilla, se infectaron células con rotavirus y se trataron con la RNasa III de *E. coli* que sólo corta RNA de doble cadena y paralelamente se trataron con RNasa A que corta RNA de cadena sencilla. Los resultados mostraron que en las células infectadas tratadas con RNasa III, la señal del anticuerpo que reconocer dsRNA desapareció, por el contrario en las células que se trataron con RNasa A la señal del anticuerpo anti- dsRNA se mantuvo (Fig. 2.1b). Adicionalmente era necesario conocer si este RNA de doble cadena que se encontraba en las células infectadas estaba dentro de partículas virales, para lo cual se purificaron TLPs, DLPs y RNA de doble cadena (dsRNA) y se trataron con RNasa III o RNasa A. Se encontró que el RNA de las partículas no se degradó con ninguna de las dos RNasas y solamente se degradó el dsRNA tratado con RNasa III. Se concluyó

que en las células MA104 infectadas con rotavirus existe dsRNA del virus que no está dentro de partículas virales y que se encuentra fuera de los viroplasmatas. No se descarta que este dsRNA pudiera representar intermediarios de replicación o dsRNA que se encuentra en estructuras alternativas a los viroplasmatas.

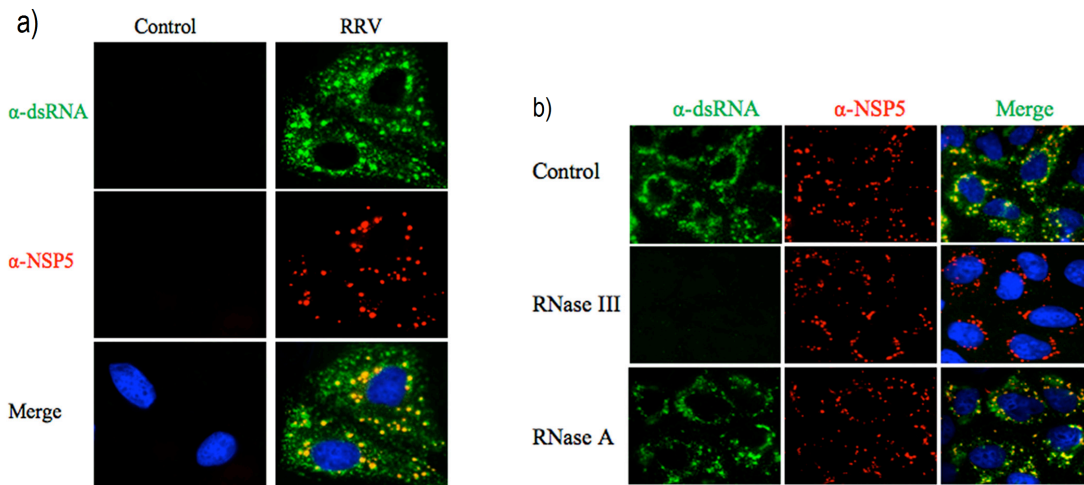


Figura 2.1. Localización del dsRNA en células infectadas con RRV. (a) Inmunofluorescencias de células MA104 infectadas con RRV a una MOI de 3 ffu/célula. A las 8 horas post-infección las células se incubaron con el anticuerpo J2 (verde) que reconoce dsRNA y el anticuerpo α -NSP5 (rojo) que reconoce viroplasmatas, los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (b) A las 8 horas post-infección las células se incubaron con 2 μ g/ml de RNasa III o 1 μ g/ml de RNasa A para posteriormente analizarlas por inmunofluorescencia. Tomado de Rojas *et al.* 2010.

2. 2. Identificación de RNAs pequeños en células infectadas con rotavirus.

Otro resultado preliminar del laboratorio fue la identificación de una población de RNAs pequeños en células infectadas con rotavirus. En estos experimentos se utilizaron células MA104 infectadas con rotavirus RRV durante 14 horas y células no infectadas (mock). Posteriormente se hizo la extracción del RNA total de ambas células y se analizó en geles de agarosa al 4%. Se encontró que en las células infectadas con RRV aparece una porción de RNAs que está en el rango de entre 20-25 bases que no se logra detectar en las células que no están infectadas (Fig. 2.2). Estos ensayos sugerían que en las células MA104 infectadas con rotavirus estaba ocurriendo la producción RNAs pequeños que podrían provenir de los virus.

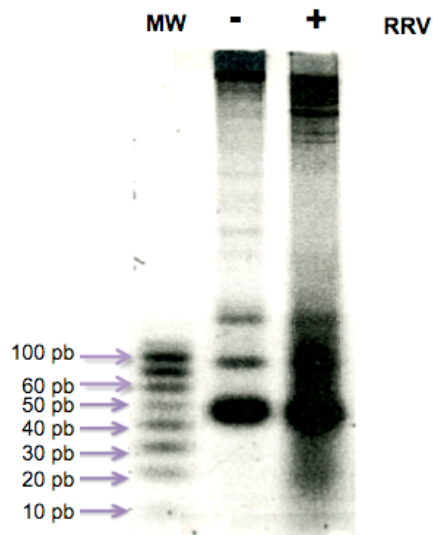


Figura 2.2. Análisis del RNA total de células infectadas y no infectadas. Electroforesis en gel de agarosa al 4% del RNA total de células infectadas durante 14 hr con rotavirus y de células sin infectar. En el gel se cargó la misma cantidad (5µg) de RNA para los dos casos. En el primer carril se muestra el marcador (MW). El gel se tiñó con bromuro de etidio.

2.3. Estudio y caracterización de los RNAs pequeños virales en mamíferos.

Los primeros intentos que se realizaron por determinar la participación de la vía del RNAi en la respuesta antiviral en mamíferos tuvieron como objetivo principal identificar la producción de RNAs pequeños que provinieran de los virus. Uno de estos trabajos es el de Parameswaran *et al.* 2010; en el que se identificó la producción de RNAs pequeños virales en células de mamíferos, y también se analizó la participación que podrían tener estos RNAs pequeños virales en la respuesta antiviral del hospedero. En dicho trabajo utilizaron 6 virus diferentes con genoma RNA (Dengue, VSV, Poliovirus, Hepatitis C, West Nile virus, Flock House virus) para infectar varias líneas celulares de mamíferos. Posterior a la infección se aisló el RNA menor a 200 bases de las células y se llevó a cabo la secuenciación masiva de los RNAs aislados. Los resultados de la secuenciación masiva mostraron que en las células infectadas con los virus había poblaciones de RNAs pequeños que provenían de los genomas virales y los denominaron RNAs pequeños derivados de virus (vsRNAs). Al hacer el alineamiento de los vsRNAs obtenidos con los genoma de los virus, encontraron que los vsRNAs correspondían a partes del genoma de los virus [45]. Al analizar la abundancia de los vsRNAs producidos en las células infectadas con HCV, encontraron

que la abundancia de las secuencias de la cadena positiva y negativa era equivalente, lo que indicaba que los vsRNAs provenían muy probablemente de intermediarios de replicación [45]. Otro de los hallazgos importantes del trabajo fue el encontrar a través de ensayos de inmunoprecipitación, que los vsRNAs co-inmunoprecipitaban con proteína AGO indicando que al estar asociados a estas proteínas, podrían dirigir la degradación de sus secuencias complementarias [45].

3. HIPÓTESIS

El RNA de doble cadena viral presente en las células infectadas con rotavirus podría ser sustrato de RNAasas tipo III como Dicer para producir RNAs pequeños virales.

4. OBJETIVOS

Determinar si durante la infección con rotavirus, el RNA de doble cadena del virus es cortado por Dicer, generando RNAs pequeños virales y caracterizar el papel de Dicer en la respuesta ante la infección viral.

Particulares

- ☆ Silenciar la expresión de Dicer 1 para analizar el efecto de su ausencia sobre la infección con rotavirus.

- ☆ Determinar la identidad y origen de los RNAs pequeños (menores a 200 bases) presentes en las células infectadas con rotavirus y las no infectadas mediante ensayos de secuenciación masiva.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Línea celular, virus y anticuerpos

Para todos los ensayos se utilizó la línea celular MA104, que son células epiteliales de riñón de mono verde africano (Rhesus). Las células MA104 se cultivaron en el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) de Invitrogen suplementado con 4% de suero bovino fetal (FBS). La cepa de virus utilizada en los experimentos fue RRV (Rhesus Rotavirus).

Los anticuerpos utilizados en los experimentos fueron: el anticuerpo α -Dicer A-2 (monoclonal) de Santa Cruz producido en ratón, los anticuerpos policlonales α -TLPs y α -vimentina fueron generados en conejos, y producidos en el laboratorio. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: cabra α -conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (Perkin Elmer), cabra α -ratón conjugado a la peroxidasa de rábano.

5.2 Infecciones virales

Los lisados virales se activaron con tripsina 1% (10 μ g/ml), se incubaron con la tripsina durante 30 min a 37°C. El lisado viral activado se mezcló con medio DMEM sin suero, y posteriormente se le agregó a las células y se les dejó con el lisado viral activado durante 1 hora a 37°C para la adsorción del virus. Posteriormente se retiró el medio y se hizo un lavado con EDTA removiendo a los virus que no se unieron a las células. Se dejaron en incubación con medio DMEM sin suero a 37°C durante las horas requeridas de infección.

5.3 Determinación del número de partículas infecciosas (Ensayo de inmunoperoxidasa).

Se sembraron células MA104 en placas de 96 pozos, las células se infectaron durante 14-16 horas y después se procedió a la fijación de la monocapa retirando el medio de las placas y adicionando 80% de acetona en PBS 1X (100 μ l por pozo) incubando 30 min a temperatura ambiente. Después se lavaron tres veces con PBS 1X y se les adicionó 50 μ l/ pozo de α -TLPs

(1:2000), incubándolas 1 hora a 37°C; posteriormente se les retiró el medio y se lavaron con PBS 1X. Luego se les adicionó 50 µl/ pozo de proteína A peroxidasa (1:3000), se incubaron durante 1 hr a 37°C, y se lavaron con PBS 1X. Por último se les adicionó 50 µl/ pozo de una preparación de carbazol (5 ml buffer de acetatos + 1.5 ml de carbazol + 10 µl de H₂O₂); transcurridos unos minutos se observaron la placas al microscopio para detectar la coloración, se lavó la placa con agua corriente, para proceder al conteo de los focos infecciosos.

5.4 Ensayo de microscopía por inmunofluorescencia

Se sembraron células MA104 en cubreobjetos de 10 mm de diámetro colocadas en placas de 48 pozos. Al alcanzar el 70% de confluencia se infectaron las células. A distintos tiempos post-infección se retiró el medio y la monocapa celular se lavó con PBS y se fijó con paraformaldehído al 2% diluido en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de fijación las células se lavaron 4 veces con NH₄Cl (50 mM) en PBS y se permeabilizaron con la solución de bloqueo (BSA1%, NH₄Cl 50mM y PBS c.b.p.) suplementada con triton X-100 dejándola 60 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplado Alexa diluidos en la solución de bloqueo durante 1 hora. Se lavaron 4-5 veces y por último la muestra se montó con Fluoprep en un portaobjetos para posteriormente visualizarla en el microscopio de epifluorescencia E600 acoplado a una cámara digital.

5.5a. Extracción de RNA total

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando Trizol (Invitrogen). Las células en monocapa, se despegaron con EDTA, se lisaron directamente adicionándoles 1 ml de trizol (Sigma) por cada 3.5 cm de diámetro de area de cultivo, el lisado se pipeteó varias veces para homogeneizar y se dejó 4-5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les adicionó 0.2 ml de cloroformo por ml de trizol, se agitaron vigorosamente durante 15 minutos y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3-4 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm a

4°C durante 15 minutos. Se tomó la fase acuosa con cuidado de no tomar las otras fases y se colocó en un tubo eppendorf nuevo. Se les agregó 50 µl de acetato de sodio 3M (1/10 vol) y 0.6 volúmenes de isopropanol. Se volvieron a centrifugar 20 min a 4 °C a 14000 rpm. Se desechó el isopropanol y se les agregó 0.5 volúmenes de etanol absoluto. Se retiró el etanol con cuidado de no llevarse la pastilla adherida en el fondo. Se adicionó H₂O libre de RNAsas para disolver el pellet y se cuantificó con en el espectrofotómetro.

5.5b.Extracción de RNA menor a 200 bases.

Se cultivaron células MA104 en los frascos de 75 cm. Se despegaron con tripsina 0.25%, luego se les agregó al menos 1 volumen de medio MEM con suero para inactivar la tripsina. Las células se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 700 µl del buffer de lisis de Quiagen. El pellet se mezcló con vortex hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se hizo la extracción del RNA de acuerdo a las instrucciones del kit de MiniRNAeasy mini kit (Quiagen) para finalmente cuantificar la cantidad de RNA obtenido en el espectrofotómetro.

5.6 Geles de agarosa y poliacrilamida

Para analizar el RNA obtenido se prepararon geles de agarosa al 4% y al 1%. Las electroforesis se hicieron en buffer TAE 1X (4.84g Tris-Base, 1.14 ml de ácido acético glacial, 2ml de EDTA 0.5M pH 8.0, 800ml de H₂O para aforar 1L), durante 1hr a 100V y posteriormente se tratarón con bromuro de etidio (0.5µg de EtBr/ml).

Los geles de poliacrilamida se prepararon con: TBE1X/7M Urea/Acrilamida 38:2/Persulfato de Amonio (10%) y TEMED. La electroforesis se llevó a acabo a 20 mA durante 25 min en el buffer TBE1X, y también fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5µg de EtBr/ml).

5.7 Transfección de los interferentes.

Se cultivaron células MA104 en cajas de 96 pozos. Se utilizaron los RNAs interferentes (siRNAs) de Dicer: 5'-UGCUUGAAGCAGCUCUGGA-3', y un siRNA Irrelevante (Irre) que no tiene un

transcrito blanco. Para los experimentos utilizamos una dilución de los siRNAs de 1:20 y de 1:100 a partir de un stock de 5nM. Se diluyeron los interferentes en DMEM sin suero y se agregaron 7.5 µl de la mezcla de siRNA por pozo. Se preparó 985 µl de MEM sin suero y 15 µl de oligofectamina, para agregar 45 µl de la mezcla de oligofectamina a cada pozo. Por último se agregaron 100 µl por pozo de DMEM con 1×10^5 células. Las células se incubaron con los siRNAs correspondientes durante 48 horas.

5.8 Ensayos de Inmunoblot

a) Proteínas (Western blot)

Se cultivaron células M4104 en placas de 96 pozos. Posteriormente se lavaron con PBS y se les agregó el buffer de lisis de Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 min. Las proteínas se separaron en geles de acrilamida 7% SDS-PAGE. La transferencia se hizo en membranas de nitrocelulosa (Millipore Bedford MA). Las membranas se bloquearon 1 hora en 5% de leche descremada diluida en PBS. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C en agitación durante toda la noche. Las membranas se lavaron con 0.05% Tween 20 en PBS para su posterior incubación con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa. La actividad de la peroxidasa se reveló con el kit Western Lightning Chemiluminiscence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences) siguiendo las instrucciones del fabricante

b) RNA (Northern blot).

El RNA extraído (10-15 mg) total o RNA menor a 200 pares de bases, se separa en el gel de poliacrilamida 15%/7M Urea/1X TBE Buffer. Posteriormente, usando un aparato de transferencia semiseca, se transfiere el RNA del gel a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham) y después se fija con el UV-stratalinker dos veces. Después se pone a la membrana en la solución de prehibridación (5X SSC/ 5X Solución Denhardt/ 100µg de DNA de espermatozoos de salmón/25% de Formamida/1%SDS), al menos 40 min a 42 °C. Transcurrido el tiempo de prehibridación se

agrega la sonda de oligonucleótidos (10pmol) que previamente fueron marcados en el extremo 5' con γ -ATP usando la T4 polinucleótido cinasa, y continuar la hibridación a 62 °C durante toda la noche (al menos 10 hr). Por último se lavó la membrana dos veces con 2X SSC/0.1% SDS/ durante 30 min y después se expuso en el fosforimager.

5.9 qRT-PCR para microRNAs

El kit utilizado para llevar a cabo los qRT-PCRs fue el Ncode miRNA First Strand (Invitrogen). El RNA total se aisló de células MA104 por medio de Trizol. Después se cuantificó el RNA en el nanodrop para saber la cantidad de RNA que se obtuvo. Posteriormente se hizo la síntesis de las colas poli A en el extremo 3' utilizando los siguientes reactivos: RNA (1 μ g de RNA), 5x miRNA Reaction Buffer (5 μ l), 25mM MnCl₂ (2.5 μ l), ATP (1 μ l), Poli A Polimerasa (0.5 μ l), agregamos H₂O necesaria para completar un volumen de 25 μ l. Después se hizo la síntesis del cDNA con la super script III RT y un primer RT universal. Posteriormente se lleva a cabo el qPCR utilizando los primers de la secuencia de interés que se requiere amplificar. Los primers utilizados para hacer el qPCR fueron los siguientes:

- Hebra positiva (5' ACTGATGAAAGACAA ATTAGA3')
- Hebra negativa (5'GGAACAGAACTTTTAAAAGCC3')
- Mir-103 5'AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA3'
- U6 5'GCAGG GCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG 3'.

Las muestras se amplificaron por PCR utilizando SYBR Green master mix, un primer universal y el oligo correspondiente para la secuencia que queríamos amplificar. El volumen total de las muestras para cada tubo era de 15 μ l, utilizando las siguientes proporciones:

	1 Reacción
- SYBER green Master Mix	7.5 μ l
- Primer universal	0.6 μ l
- H ₂ O	2.9 μ l
- Oligo de interés	3 μ l
- cDNA	1 μ l
Total	15 μ

Las muestras se colocaron por triplicados en un termociclador (Applied Biosystems 7500 System SDS software 1.2.1), usando las siguientes condiciones: 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 90°C-15 segundos, y 60°C 30 segundos. Para determinar si los oligos no formaban dímeros, en cada experimento se agregó una etapa de disociación de 60 a 95°C durante 30 min. Finalmente se determinó el Ct de cada muestra con el software 7500 System SDS detection.

Se cuantificó la cantidad relativa del RNA por medio del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para obtener los cálculos con este método utilizamos la siguiente metodología:

- ❖ El RNA de cada condición se amplificó por PCR con los oligos dirigidos contra la secuencia de interés y contra los genes de control endógeno (U6 y Mir103).
- ❖ Se obtuvieron los valores de Ct para cada muestra.
- ❖ Se calculó primero el $\Delta Ct = Ct$ (de la secuencia de interés amplificada) – Ct (del gen endógeno).
- ❖ Después determinamos el valor de $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (de la secuencia de interés) en este caso en células infectadas - ΔCt (muestra de la referencia con la que se quiere comparar) que eran las células no infectadas.
- ❖ Una vez obtenidos los valores de ΔCt , se hizo el siguiente cálculo $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Debido a esto el valor de la muestra de referencia será de 1.

5.10. Preparación de las bibliotecas para la Secuenciación Masiva

Se hizo la extracción del RNA menor a 200 bases de células infectadas con rotavirus y células no infectadas con rotavirus utilizando el kit miRNeasy de Qiagen. Posteriormente, se prepararon las bibliotecas usando el método de secuenciación para RNAs pequeños (Sample preparation guide Small RNA.v1.15). Primero se hizo la ligación de los adaptadores que son oligos con secuencias conocidas que se ligan en el extremo 3', la ligasa utilizada une los adaptadores en las secuencias que poseen un hidroxilo (OH) en el extremo 3'. Posteriormente se hizo la ligación de los adaptadores en el extremo 5' para proceder hacer el RT generando el cDNA. El cDNA se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) para seleccionar la banda que tuviera el RNA del tamaño que estábamos buscando que en este caso eran secuencias de entre 21 a 25 bases. Tomando en cuenta la longitud de los adaptadores, la cual es de aproximadamente 35 bases, las secuencias que se aislaron del gel, tenían un tamaño de 90 bases. El DNA seleccionado se utilizó para llevar a cabo la secuenciación masiva por medio de la plataforma de Illumina.

5.10. Análisis de los datos

A las lecturas obtenidas de la secuenciación se les quitaron los adaptadores y se hizo un alineamiento con el programa Bowtie (-n3 -l e70 - -best) donde 3 es el número total de "mismatches" que se permiten a lo largo de la secuencia y 70 representa que las secuencias deben tener un 70% de similitud con la secuencia que alinean.

Para el estudio de expresión diferencial se utilizó el programa NOI-seq- sim. Este programa primero normalizó las lecturas por el método de RPKM (Tarazona *et al.* 2011) Luego calculó un valor para cada microRNA al cual se le denominó señal que se obtiene a través obtener los valores de M y D de la condición infectada (RRV) y la no infectada (mock) usando la siguientes fórmulas:

$$M = \log_2 \frac{\text{expresión Micro1}_{RRV}}{\text{expresión Micro1}_{Mock}} \quad D = |\text{expresión Micro1}_{RRV} - \text{expresión Micro1}_{Mock}|$$

Luego el programa calculó el valor que denominó ruido para cada microRNA que se obtuvo a través de calcular los valores de M y D de los replicados de una misma condición:

$$M = \log_2 \frac{\text{expresión Micro 1}_{RRV}}{\text{expresión Micro 1}_{RRV \text{ (Réplica)}}} \quad D = |\text{expresión Micro 1}_{RRV} - \text{expresión Micro 1}_{RRV \text{ (Réplica)}}|$$

$$M = \log_2 \frac{\text{expresión Micro 1}_{Mock}}{\text{expresión Micro 1}_{Mock \text{ (Réplica)}}} \quad D = |\text{expresión Micro 1}_{Mock} - \text{expresión Micro 1}_{Mock \text{ (Réplica)}}|$$

Ya que obtuvo los valores de señal y del ruido se contrastaron los valores. Los microRNAs que tenían el valor del ruido fueron descartados y los que estaban fuera del ruido se consideró que tenían una expresión diferencial.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización del papel antiviral de Dicer durante la infección por rotavirus.

Uno de los objetivos del proyecto era determinar si la proteína Dicer participaban en la respuesta contra la infección por rotavirus. Para estudiar el papel de Dicer durante el proceso de infección viral se utilizó el enfoque de silenciar la expresión de esta proteína mediante RNAs de interferencia (siRNAs). Posteriormente evaluamos el efecto de su ausencia en células MA104 infectadas con RRV al medir la infectividad y el rendimiento viral. Para corroborar el silenciamiento de la proteína, se llevaron a cabo ensayos de western blot utilizando células MA104 que se transfectaron con siRNAs irrelevantes que no tienen mensajeros celulares blancos y siRNAs para Dicer. Adicionalmente para el estudio se utilizaron células que sólo se trataron con el medio de lipofección sin ningún siRNA (células control). En la figura 6.1 se muestra la imagen de un western blot representativo del silenciamiento de la proteína Dicer. Las células transfectadas con los interferentes de Dicer se observó niveles más bajos de la proteína comparadas con las células tratadas con los interferentes irrelevantes y las células control. En las células tratadas con los siRNAs irrelevantes también se observa una ligera disminución de la proteína comparada con el control, esto puede deberse a que el propio tratamiento con cualquiera de los interferentes causa que algunas de las células se despeguen de la monocapa y mueran, por lo tanto al haber menos células hay menos proteína. Al analizar el control de carga que en este caso fue vimentina (Vim), se corroboró que la disminución observada de la proteína Dicer es debida al tratamiento con los siRNAs (Fig 6.1).

Para determinar el efecto de la ausencia de Dicer en la infección con rotavirus, se infectaron células MA104 con RRV que habían sido transfectadas con siRNAs de Dicer y siRNAs irrelevantes. También se utilizaron células no transfectadas con siRNAs que solamente fueron tratadas con el medio de lipofección (control). Después de 14 horas de infección se midió la infectividad y el rendimiento viral. La infectividad y el rendimiento se determinaron mediante el conteo de los focos infecciosos obtenidos por medio de ensayos de inmunoperoxidasa (Materiales y métodos, sección 5.3).

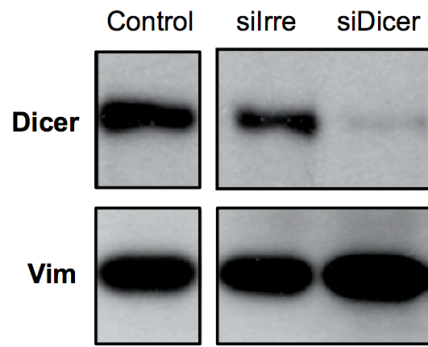


Figura 6.1. Silenciamiento de Dicer. Para llevar a cabo todos los experimentos se utilizaron células MA104. Las células se transfectaron con los RNAs interferentes Irrelevantes (Irre) y Dicer. Las células permanecieron con los interferentes durante 48 horas y transcurrido ese tiempo se trataron con el buffer Laemmli (Tris pH 6.8M, SDS 10%, Glicerol, EDTA 0.5M, azul bromofenol) para posteriormente cargar las muestras en gel SDS-PAGE 7.5%. Para la detección de las proteínas se utilizaron anticuerpos contra α -Dicer y α -vimentina. En todos los casos como control de carga se utilizó vimentina. La imagen mostrada es uno de los geles representativo de cuatro experimentos independientes similares.

Los resultados del conteo de los focos infecciosos se muestran en la Figura 6.1.1. Encontramos que en las células que tenían silenciada la expresión de Dicer la infectividad aumentó aproximadamente 2.5 veces comparado con las células tratadas con los siRNAs irrelevantes y las células control (Fig. 6.1.1 A). En el caso del rendimiento viral, cuando se cuantificaron los focos infecciosos, encontramos que el rendimiento también aumentó casi dos veces en las células transfectadas con los siRNAs de Dicer en comparación con las células control y las tratadas con los siRNAs irrelevantes (Fig.6.1.1B). Los datos obtenidos sugieren que la proteína Dicer tiene una contribución en la defensa contra el virus y por lo tanto la actividad de Dicer podría representar un mecanismo de respuesta antiviral, sin embargo falta caracterizar la manera por la cual Dicer está limitando la producción de virus en las células MA104 infectadas con RRV.

2. Caracterización de la localización y presencia de la proteína Dicer durante la infección por rotavirus.

Se sabe que durante infecciones virales como el virus de la influenza A, el nivel de la proteína Dicer se puede ver disminuida debido a la infección [38]. Debido a que Dicer es un componente importante en la vía del RNAi decidimos analizar la localización de la proteína Dicer durante la infección con rotavirus por medio de ensayos de inmunofluorescencia.

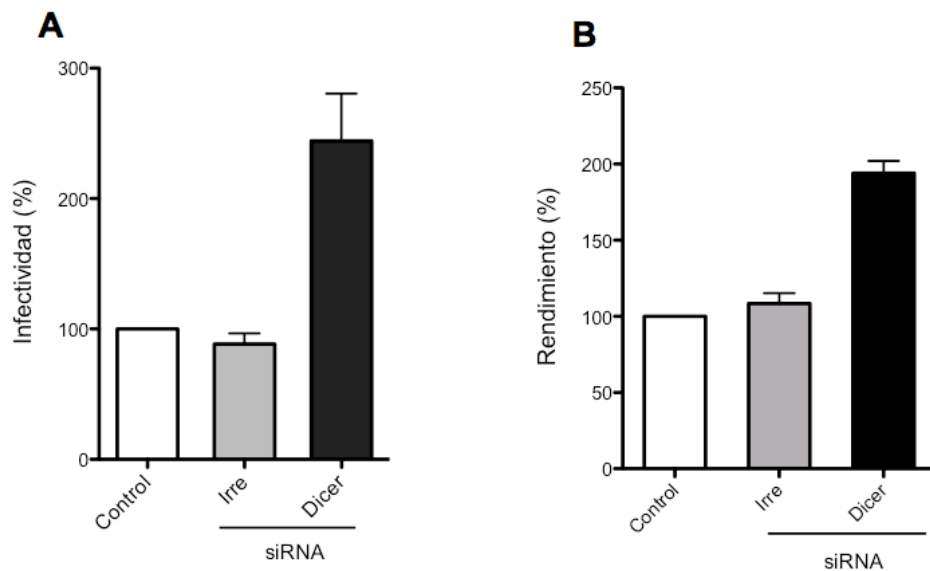


Figura 6.1.1. El rendimiento y la infectividad de rotavirus aumentan en ausencia de la proteína Dicer. Se utilizaron células MA104 que se transfectaron con los RNAs de interferencia (siRNAs) indicados o sólo se trataron con el medio de lipofección (control), 48 horas post-transfección las células se infectaron con RRV. Para medir infectividad (A) se utilizó una MOI de 0.02 y para el rendimiento (B) una MOI de 0.5, en ambos casos a las 14 horas post-infección se fijaron las células para hacer el conteo de los focos infecciosos por medio de los ensayos de inmunoperoxidasa. Los datos presentados representan el promedio con la desviación estándar de cuatro experimentos independientes.

Utilizando anticuerpos específicos que detectan a la proteína, encontramos que Dicer se encuentra distribuida homogéneamente en el citoplasma celular en células sin infectar y esta distribución no cambió de manera significativa en las células infectadas con RRV (Fig. 6.2), ya que la proteína se mantuvo en el citoplasma de las células aún durante la infección. Con estos ensayos descartamos la posibilidad de que durante la infección con RRV Dicer pudiese relocalizarse cerca de estructuras como los viroplasmos donde se produce dsRNA debido a que en esas estructuras ocurre la replicación del virus.

Por otra parte para evaluar si durante la infección con rotavirus se modificaban los niveles de la proteína Dicer, se infectaron células MA104 con rotavirus RRV, y mediante ensayos de western blot se analizó la acumulación de Dicer a diferentes horas post-infección (3, 6, 9 y 12, y 14 horas). Encontramos que Dicer se mantiene presente durante la infección con RRV desde las 3 hasta las 14 horas (Fig. 6.2.1 A). Sin embargo observamos que conforme transcurre la infección la cantidad de la proteína va disminuyendo. Esta disminución se corroboró por medio del análisis de densitometría de dos experimentos independientes. Por lo tanto la infección con RRV disminuye los niveles de Dicer (Fig. 6.2.1 B).

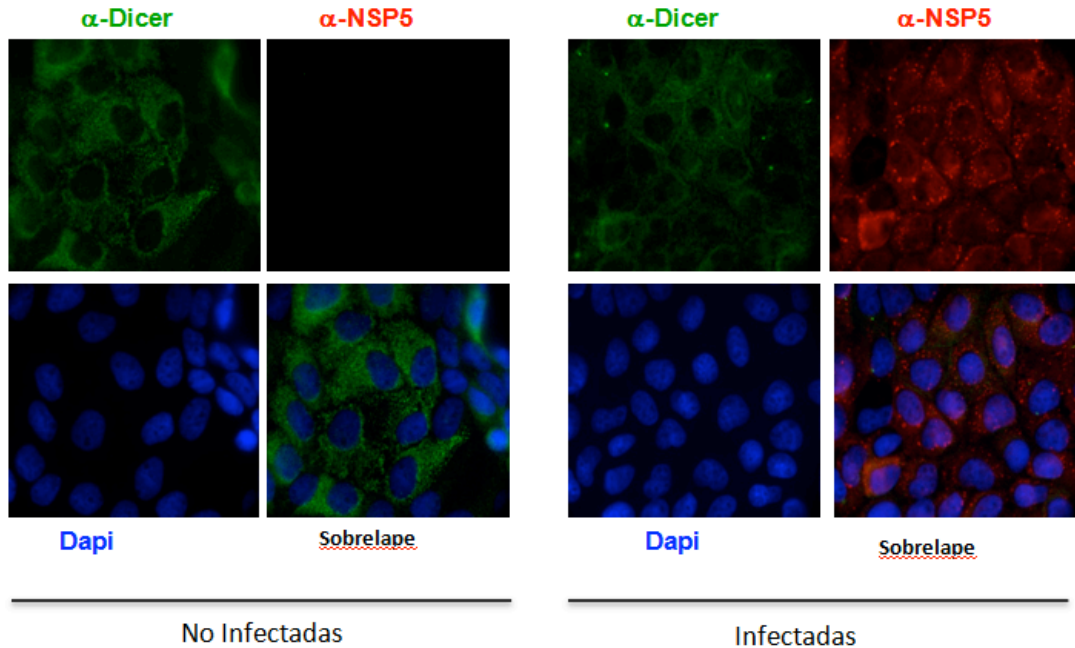


Figura 6.2. Localización intracelular de Dicer durante la infección por RRV. Se utilizaron células MA104 no infectadas e infectadas con RRV a una MOI de 1 ffu/célula durante 14 horas. Las muestras fueron procesadas y analizadas por ensayos de inmunofluorescencias. Se utilizaron anticuerpos α -Dicer, α -NSP5 que reconoce viroplasmos y para identificar los núcleos se usó DAPI.

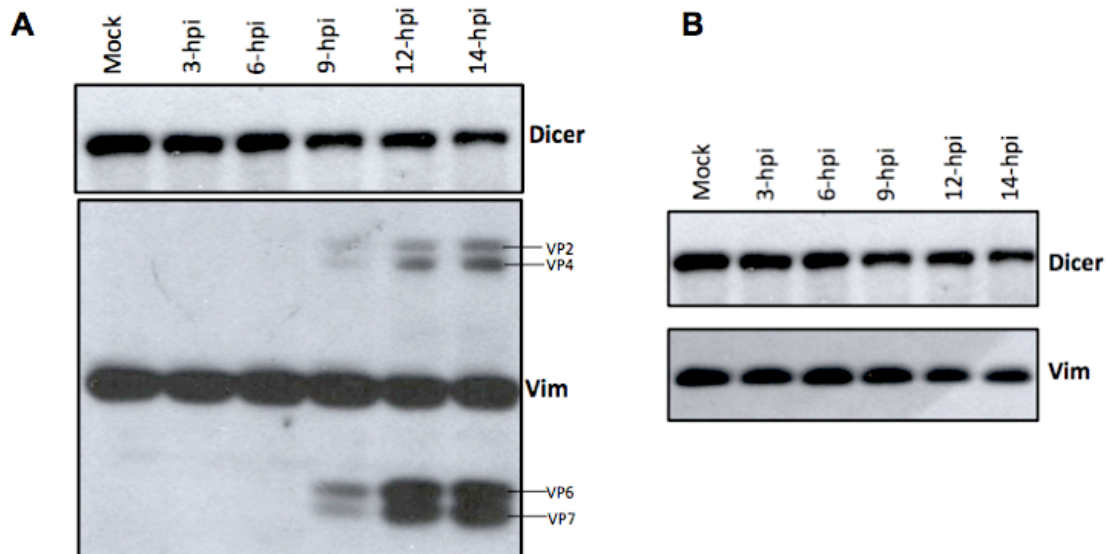


Figura 6.2.1. Los niveles de la proteína Dicer disminuyen durante la infección por RRV. A) y B) Se utilizaron células MA104 no infectadas (mock) y células infectadas con rotavirus a una MOI de 10 ffu/célula, a diferentes horas post-infección (hpi). Transcurrido el tiempo de infección las células se trataron con el buffer Laemmli, para posteriormente separar las proteínas en un gel SDS-PAGE 7.5%. Se utilizaron los anticuerpos de α -Dicer, α -Vim y α -TLPS. A) En la imagen se muestra el Western de Dicer, con el control de carga (Vim) y las TLPs, B) es la imagen del mismo gel pero solamente mostrando Dicer con el control de carga (Vim).

Esta disminución puede deberse a que en las células infectadas con rotavirus la traducción de las proteínas celulares disminuye conforme transcurre la infección y Dicer pudiera ser una de las proteínas celulares que disminuye durante la infección. En base a estos datos determinamos que en las células infectadas con RRV la proteína Dicer mantiene su localización subcelular ya que no sufre ninguna relocalización y además la proteína se mantiene presente en las células infectadas con RRV, aunque sus niveles disminuyen conforme avanza la infección.

6.3. Identificación de los RNAs pequeños presentes en las células infectadas con rotavirus.

Previamente en nuestro laboratorio se observó que en las células MA104 infectadas con rotavirus RRV durante 14 horas, había una población de RNAs pequeños dentro de los cuales se encontraban RNAs de 20-30 bases que era poco notoria en células sin infectar (Fig. 2.2). Nos enfocamos en esta población de RNAs pequeños porque podrían representar productos generados por la proteína Dicer, ya que esta RNasa corta el RNA de doble cadena y produce RNAs que tienen una longitud entre 20 a 25 bases. Los primeros experimentos realizados se hicieron con el objetivo de confirmar la presencia de esa población de RNAs pequeños en las células infectadas con RRV. Para llevar a cabo dichos experimentos se infectaron células MA104 a una MOI de 10 ffu/célula durante 14 horas. La extracción del RNA total de las células infectadas y de las células no infectadas se hizo por el método de extracción de RNA con Trizol (Sección 5.5). Posteriormente el RNA obtenido se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con urea, cargando la misma cantidad de RNA para cada una de las muestras. En las células infectadas se detectó una población de RNA que en base al marcador de peso molecular nos indicaba que se encontraba dentro del rango de tamaño de entre 20 a 30 bases que eran los RNAs de tamaño que nos interesaban (Fig 6.3). En contraste esta porción de RNA era poco detectable en células sin infectar (Fig. 6.3). Estos resultados nos permitieron confirmar que en células MA104 infectadas con RRV durante 14 horas está presente una población de RNAs pequeños la cual es menos abundante en células sin infectar.

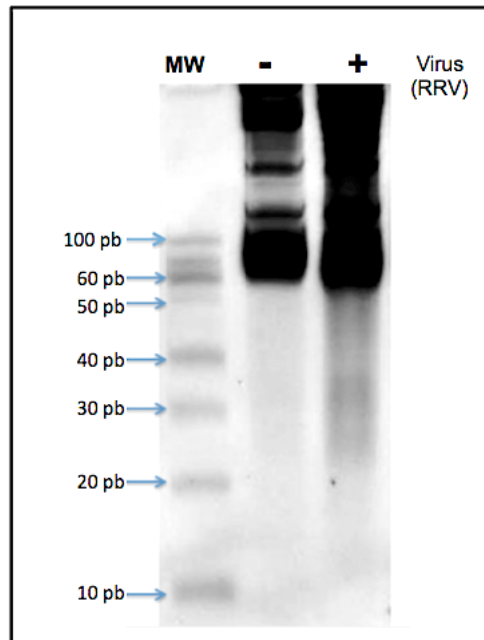


Figura 6.3. Análisis del RNA total de células infectadas y no infectadas con rotavirus. Electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) desnaturalizante 7M urea, con buffer TBE. La extracción del RNA analizado se llevó a cabo con trizol a partir de células MA104 no infectadas (mock) y células infectadas con rotavirus RRV a una MOI de 10 durante 14 horas. Para las dos condiciones con virus y sin virus (+-) se cargó la misma cantidad de RNA (5µg). En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (MW) que va de los 10 a 100 pares de bases.

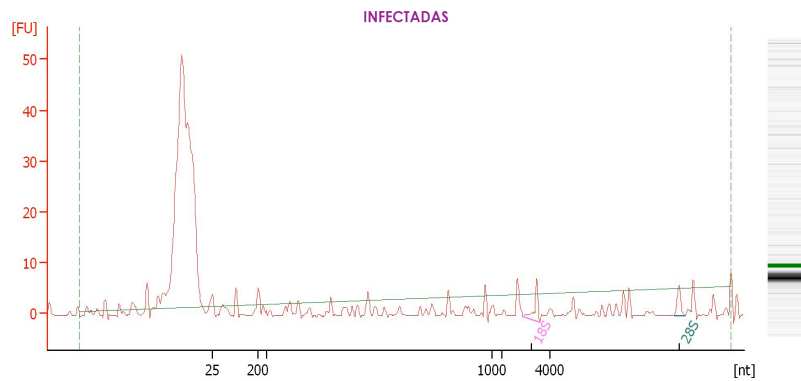
6.4. Determinación de la identidad y posible origen de los RNAs pequeños producidos durante la infección.

El siguiente paso después de la identificación de los RNAs pequeños detectados en los gels donde se analizó RNA de células infectadas con rotavirus era el determinar que representaban estos RNAs. Debido a que en las células existe maquinaria de degradación del RNA, existía la posibilidad de que esta porción de RNA observado pudiera representar productos de degradación inespecífica del RNA. Uno de los métodos más precisos y eficientes utilizados actualmente para caracterizar el RNA es por medio de la secuenciación masiva. Se eligió hacer secuenciación masiva de RNAs pequeños por medio de la plataforma de Illumina para secuenciar todos los RNAs.

Para la secuenciación masiva, se hizo la extracción del RNA menor a 200 bases de células MA104 infectadas con rotavirus a una MOI de 10 durante 14 horas y de las células no infectadas (mock

infected). Una vez purificado el RNA y antes de someter las muestras a la secuenciación, se analizó la calidad y la integridad del RNA que se utilizaría para secuenciar por medio del bioanalizador. En la Figura 6.4, se muestra el electroferograma obtenido del análisis de las dos muestras así como las fotografías de los gels de la electroforesis generados por el programa. La calidad del RNA aislado fue la adecuada ya que al observar las bandas de la muestra en el gel aparecían bien definidas y no había ningún barrido, lo cual indicaba que el RNA no estaba degradado. Adicionalmente también se determinó que ambas muestras estaban enriquecidas con RNAs menores a 200 bases ya que no existía la presencia de RNAs ribosomales como 18S y 28S (Fig. 6.4). Una vez corroborada la calidad del RNA aislado, se utilizó para hacer la preparación de las bibliotecas por medio del protocolo de secuenciación de RNAs pequeños de Illumina (Materiales y Métodos 5.10).

A



B

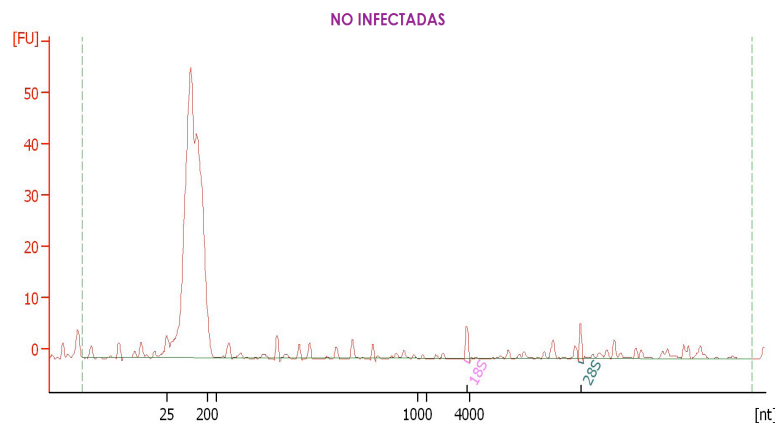


Figura 6.4. Análisis del RNA utilizado para preparar las bibliotecas. En ambos casos se utilizaron células M4104 infectadas con RRV a una MOI de 10 durante 14 horas y células no infectadas (mock infected). (A) y (B) Se muestra el electroferograma obtenido del bioanalizador. El eje de las X representa la longitud del RNA, y el eje de las Y el

tamaño en pares de bases del RNA. En el extremo derecho se muestra el gel obtenido de la electroforesis, la banda verde representa el marcador de peso que mide 25 bases y la banda oscura representa el RNA contenido en la muestra.

El número de secuencias totales obtenidas para cada condición (infectadas y no infectadas) después de realizar la secuenciación masiva se muestran en la Tabla 6.4.1. Para las células infectadas se obtuvo un total de 56,174,611 de secuencias y 52,573,515 de secuencias para las no infectadas. Las secuencias totales obtenidas se pasaron por un filtro de calidad que asigna el propio programa del secuenciador para eliminar las secuencias de baja calidad. Para poder determinar las calidades de las secuencias se utiliza un “score” denominado Q, el cual se obtiene de la siguiente fórmula: $Q_{\text{PRED}} = -10 * \log_{10}(P_e)$, donde P_e es la probabilidad estimada de haber cometido un error en la asignación del nucleótido correspondiente. Después de pasar las muestras por el filtro de calidad se recuperaron 8,784,496 secuencias para las infectadas y 10,349,993 para las no infectadas (Tabla 6.4.1).

Tabla 6.4.1. Número de Secuencias obtenidas por medio de la plataforma de Illumina. En la tabla se muestra el número de secuencias totales obtenidas de la secuenciación masiva así como el número de secuencias recuperadas después de pasarlas por el filtro de calidad para seleccionar las que tuvieran una alta calidad (<Q=30).

	No. de Secuencias Totales	No. de Secuencias después del filtro de calidad.
Infectadas	56,174,611	8,784,496
No Infectadas	52,573,525	10,349,993

Posteriormente se hizo un análisis de distribución de las longitudes de las secuencias obtenidas con el objetivo de conocer el rango de tamaño que presentaban. Este programa elimina los adaptadores para poder determinar las longitudes aproximadas de las secuencias de interés. Lo que encontramos fue que la mayoría de las secuencias obtenidas por la secuenciación masiva tanto en las células infectadas como en las no infectadas tenían un tamaño de entre 21-24 bases (Figura 6.4.2).

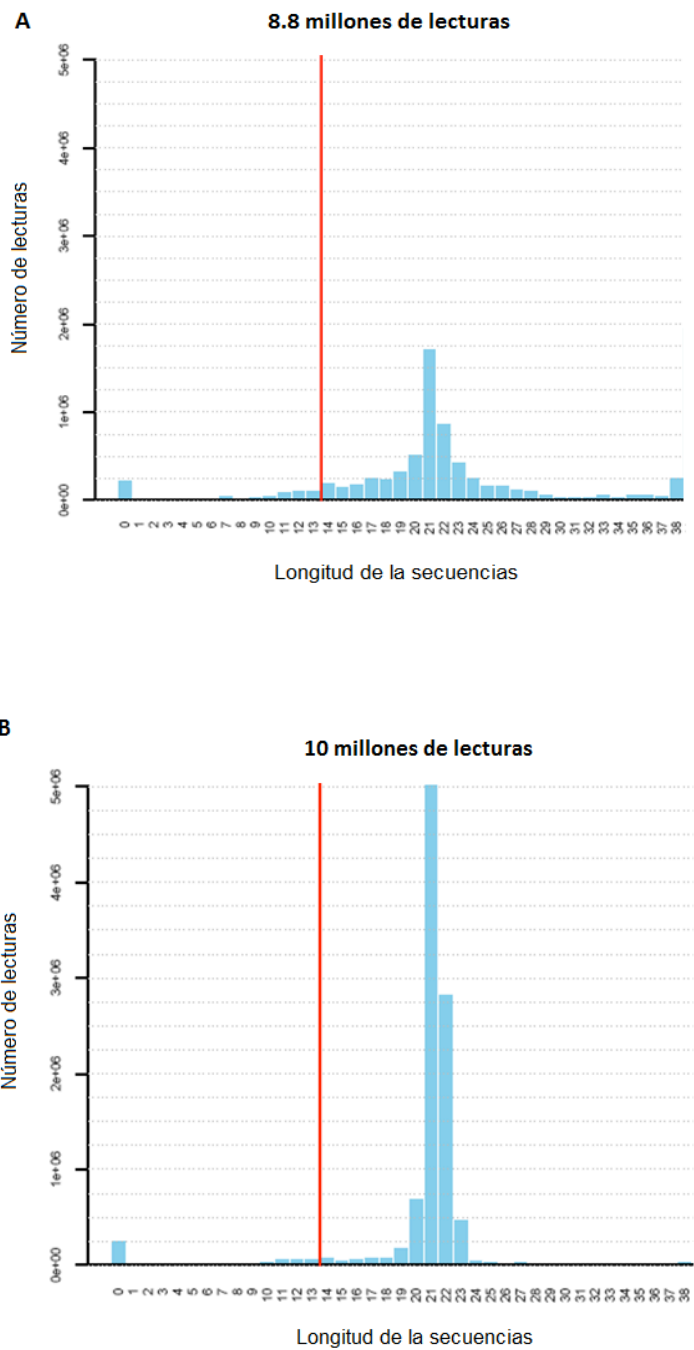


Figura 6.4.2. Análisis de longitudes de las secuencias. (A) Secuencias obtenidas de células infectadas y (B) de células no infectadas. En el eje de las X se muestra la longitud que tienen las secuencias, el eje de las Y representa el número de lecturas que tiene dicha secuencia.

Para determinar si los RNAs pequeños obtenidos de la secuenciación provenían del genoma viral, se llevó a cabo un análisis de alineamiento. Para hacer este análisis se utilizaron las

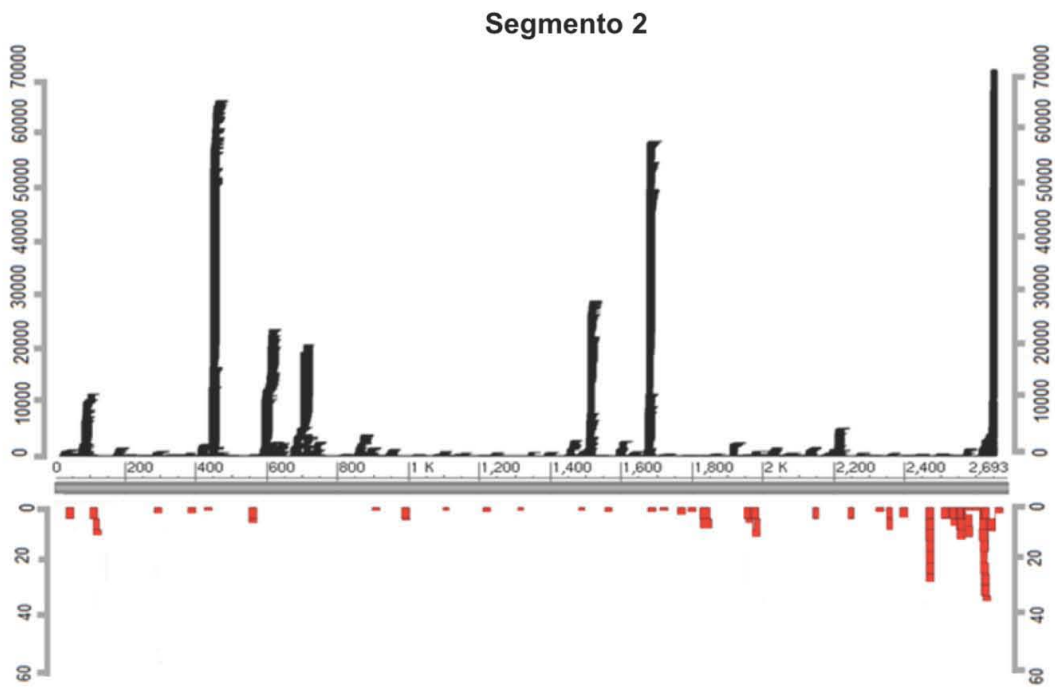
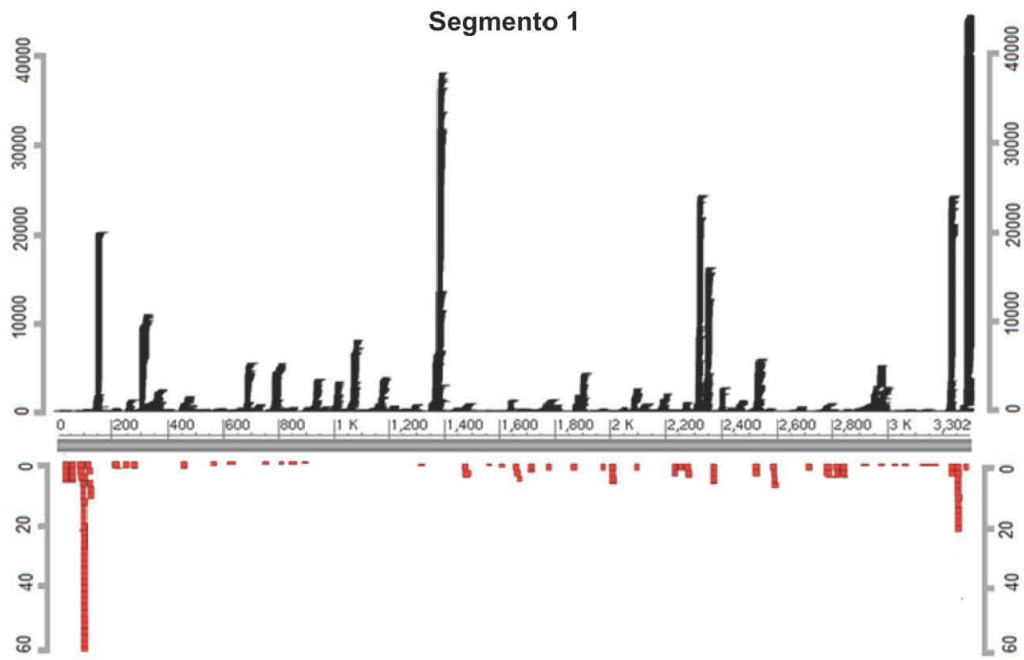
secuencias obtenidas después del filtro de calidad y se eliminaron los adaptadores (Tabla 6.4.3). El alineamiento se hizo con el programa Bowtie utilizando el genoma de RRV como referencia. En la Tabla 6.4.3. se muestra el número de secuencias que alinearon contra el genoma de RRV. En el caso de las muestras infectadas de las 6527989 de secuencias 3357173 alinearon contra el genoma de rotavirus RRV. En el caso de las secuencias de las células sin infectar de las 9389842 alinearon 5,577 contra el genoma de RRV. El alineamiento realizado con Bowtie nos permitió establecer que el 51.42% de las secuencias de RNAs pequeños de las células infectadas corresponden a regiones del genoma de rotavirus. En células no infectadas el 0.06% de las secuencias alinearon a partes del genoma del virus. Este porcentaje puede representar contaminación de las muestras no infectadas con RRV.

Tabla 6.4.3. Resultados del alineamiento con Bowtie. En la tabla se muestra el número de secuencias que se obtuvieron al quitar los adaptadores para ser utilizadas en el alineamiento con Bowtie. También se muestran las secuencias que alinearon con el genoma de RRV y el porcentaje de alineamiento.

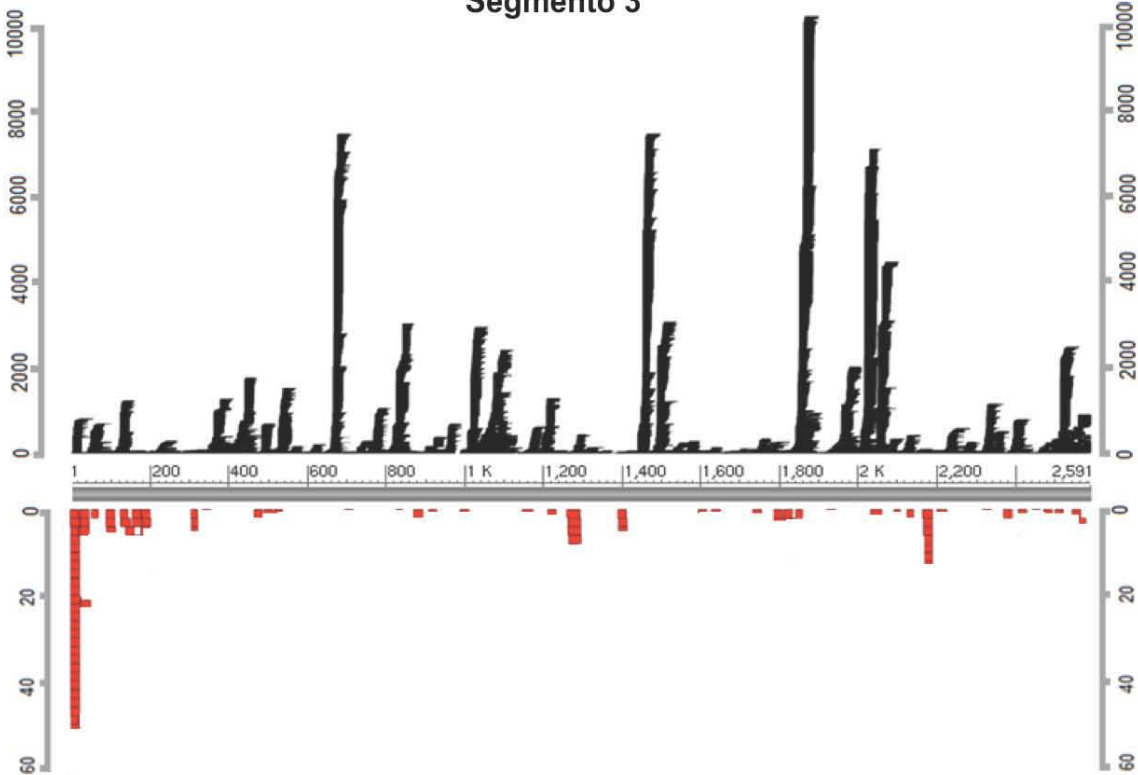
	Secuencias sin adaptador	Alineados vs RRV	Porcentaje de alineamiento
Infectadas	6,527,989	3,357,173	51.42%
No Infectadas	9,389,842	5,577	0.06%

6.5. Análisis de cobertura de los RNAs pequeños virales.

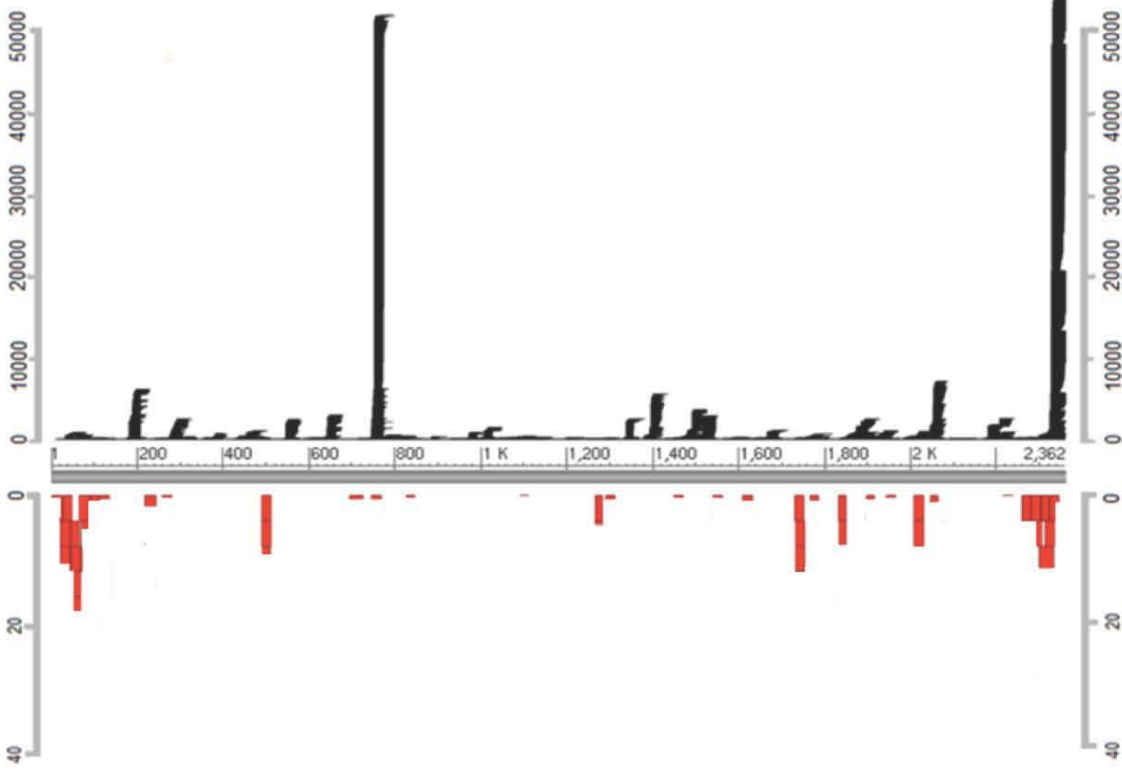
Una vez determinado con el alineamiento realizado con Bowtie que la mitad de las secuencias de RNAs pequeños (21-25 bases) producidos durante la infección por rotavirus representaban partes del genoma viral, lo siguiente que nos interesaba era el determinar en que partes del genoma de RRV representaban estas secuencias. Se llevó a cabo un análisis de cobertura para poder visualizar las secuencias alineadas a lo largo del genoma utilizando el programa R para el alineamiento con Bowtie (Fig.6.5) En la Figura 6.5 se muestran las 11 gráficas de cobertura generadas para cada uno de los segmentos de RRV.

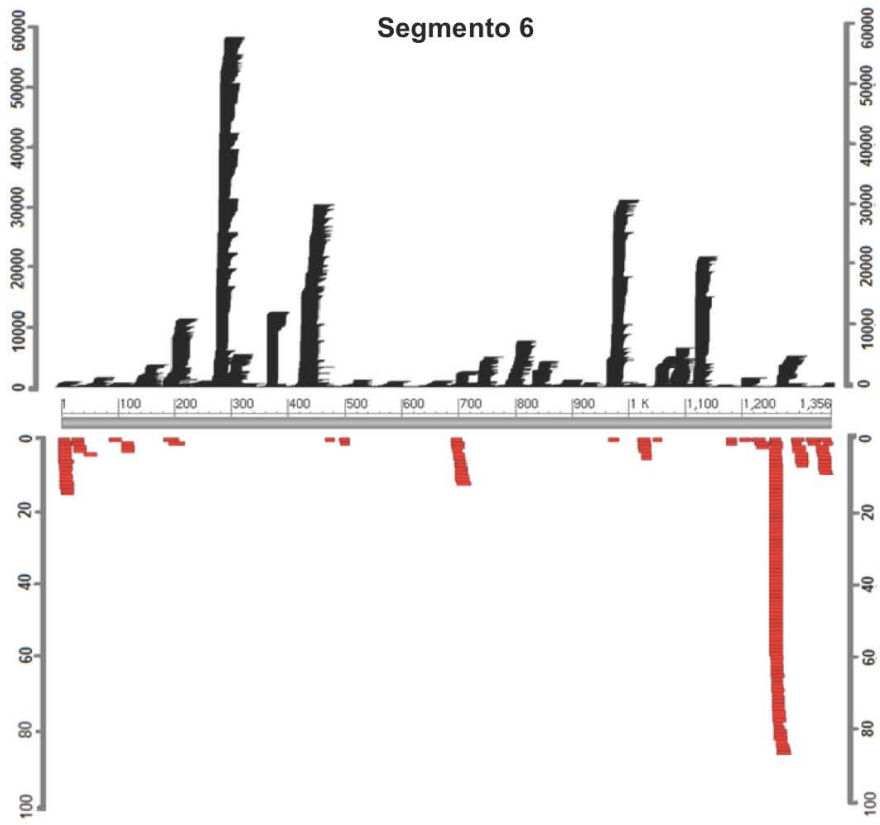
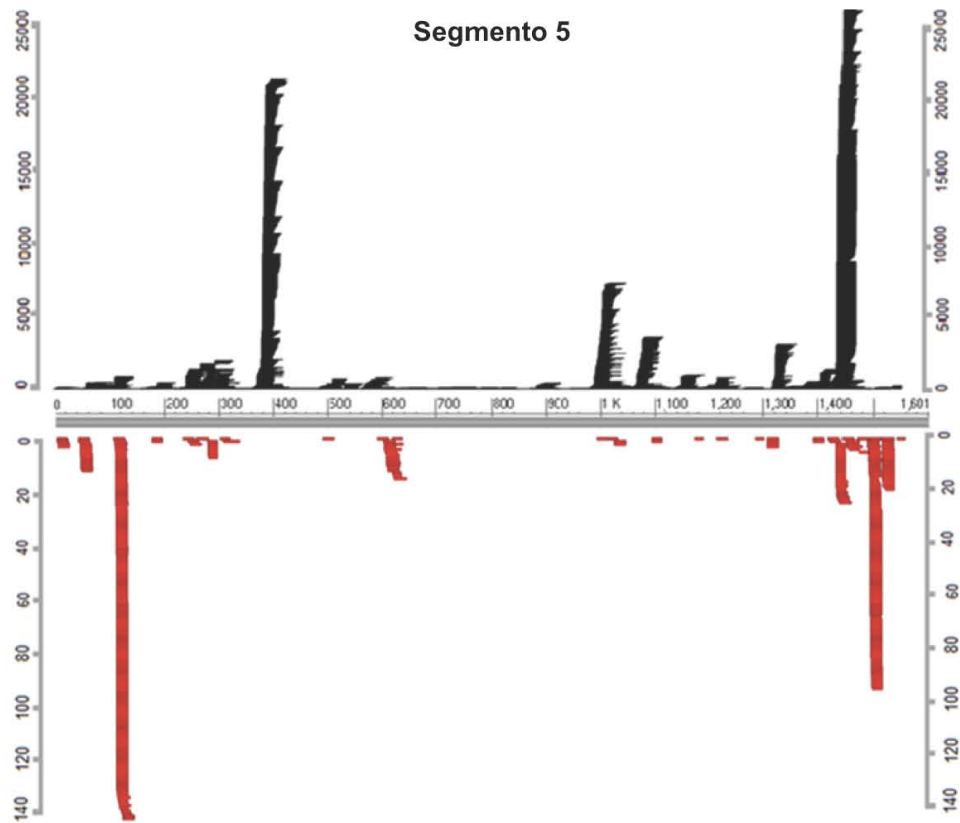


Segmento 3

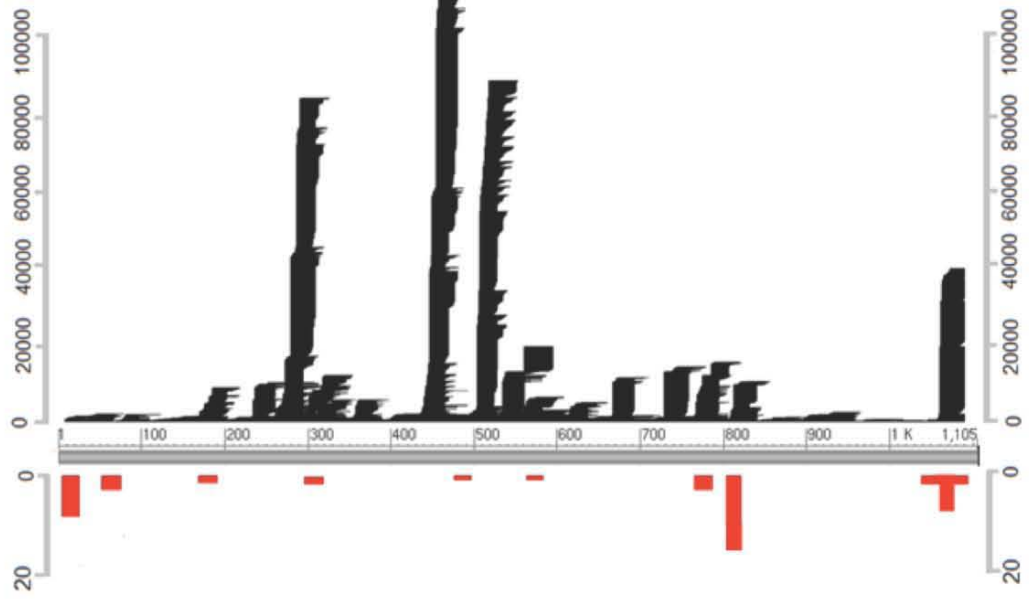


Segmento 4

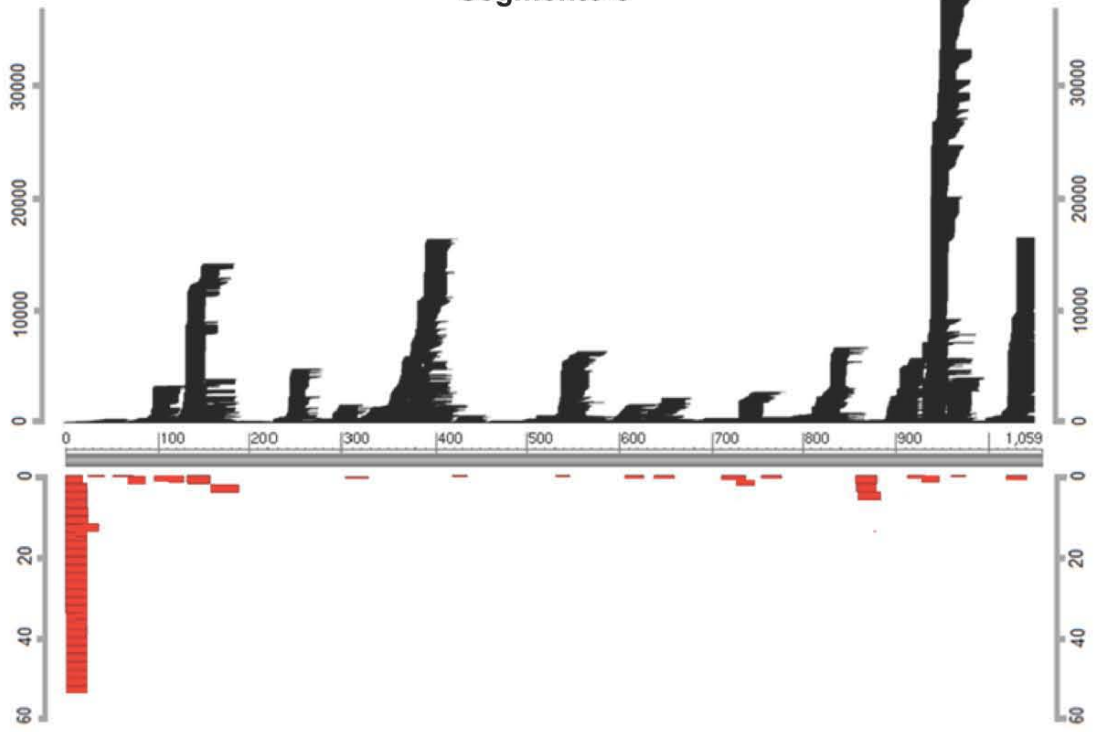




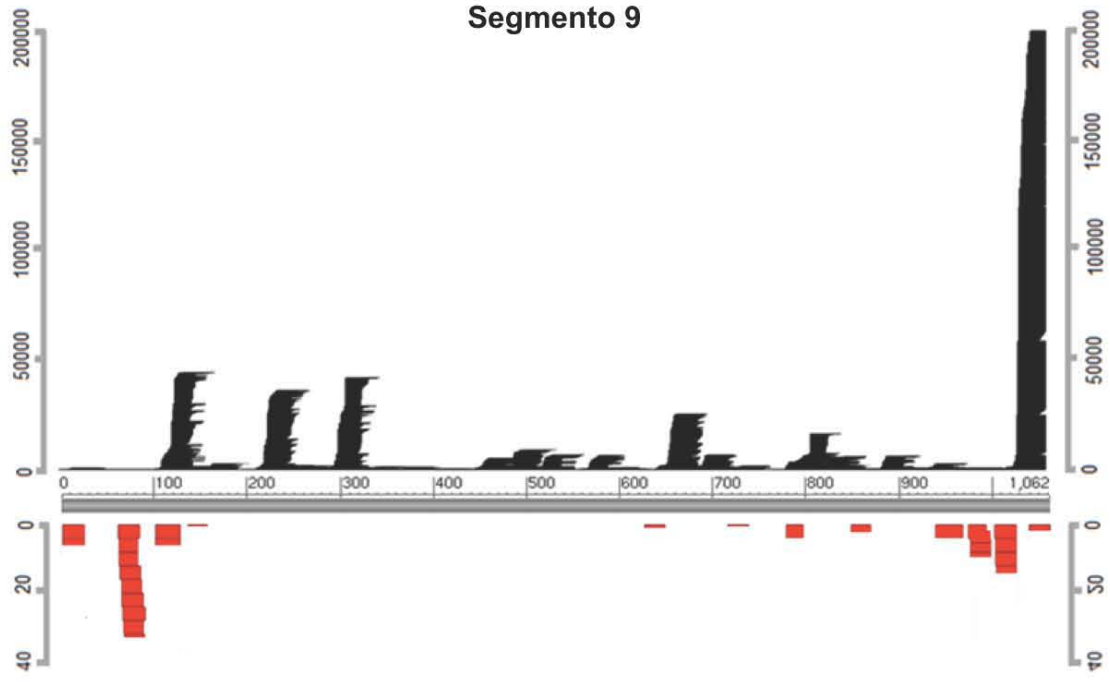
Segmento 7



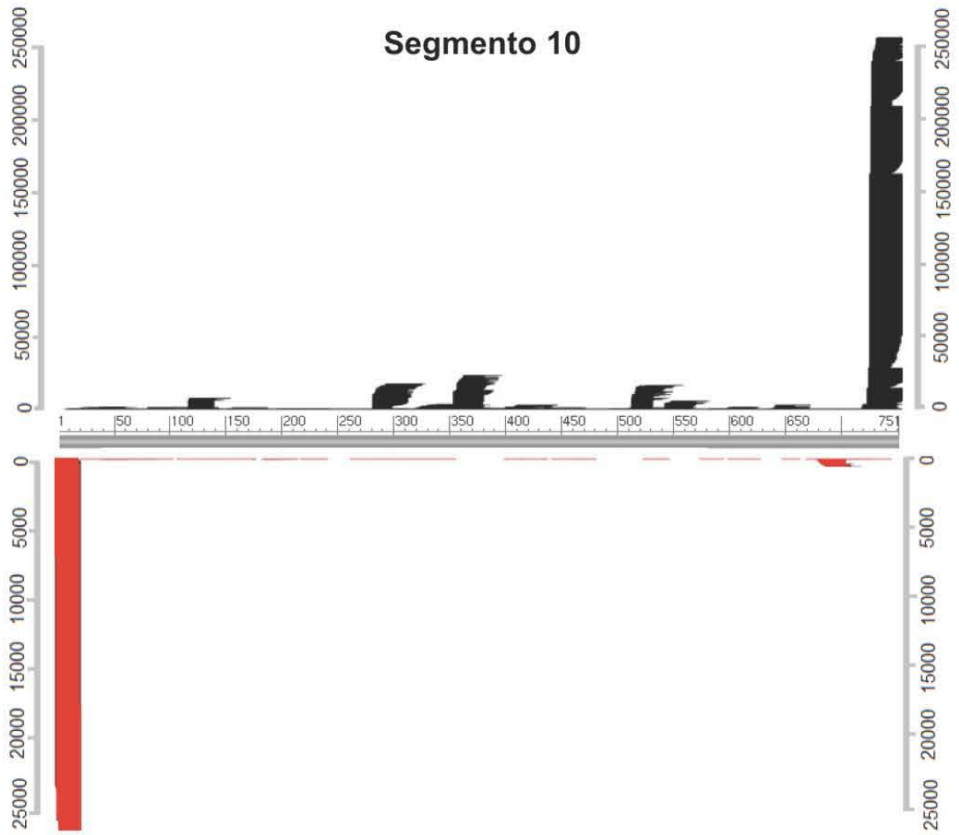
Segmento 8



Segmento 9



Segmento 10



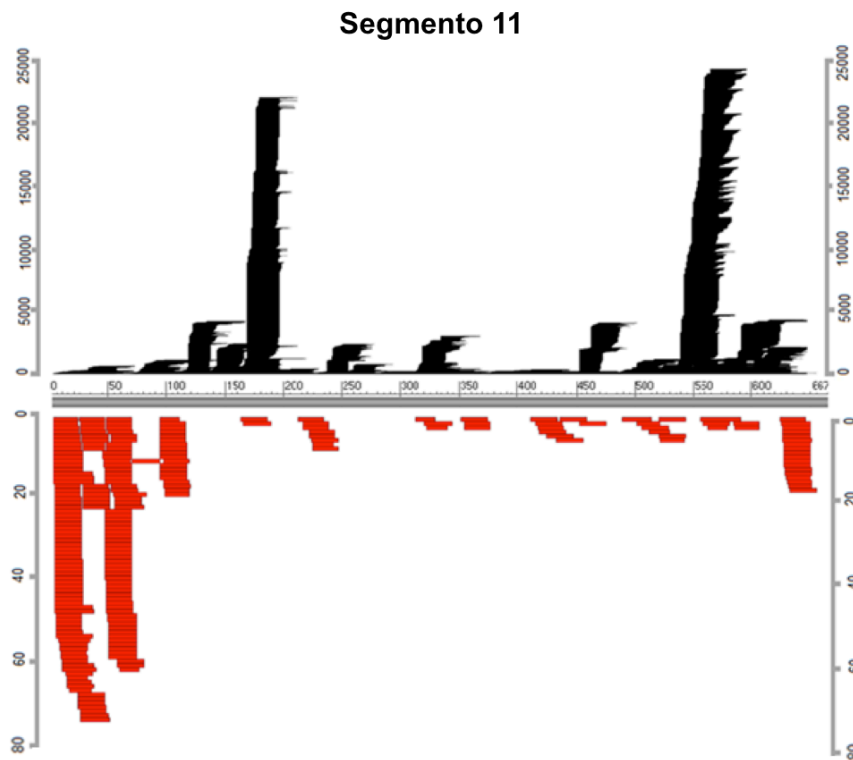


Figura 6.5. Gráficas de cobertura de las secuencias de RNAs pequeños a lo largo de los once segmentos de rotavirus. En cada gráfica está representado en el eje de las X la posición de la secuencia en el genoma, y en el eje de las Y el número de lecturas que tiene cada secuencia. En negro se muestran las secuencias que provienen de la cadena positiva del genoma y en rojo las que provienen de la negativa. Las gráficas se generaron utilizando el programa R.

El análisis de las gráficas de cobertura obtenidas con el alineamiento hecho con el programa Bowtie mostró que en los RNAs pequeños virales (vsRNAs) producidos durante la infección con rotavirus representan los once segmentos que componen el genoma de RRV. La distribución y localización de las secuencias de los vsRNAs a lo largo de los once segmentos es diferente para cada gen, es decir que en algunos de los segmentos hay regiones que tienen secuencias con muchas lecturas y en otras regiones hay muy pocas lecturas. En el caso de los segmentos 1, 2, 4, 8, 9 y 10 (Fig. 6.5) los extremos presentan muchas lecturas lo que podría sugerir que en esos genes el corte se da de manera preferencial en esa región, sin embargo no es una regla general ya que para otros segmentos hay regiones con muchas lecturas que no están en los extremos. Los análisis de alineamiento nos permitieron conocer que vsRNAs producidos a las 14 horas provienen de diferentes partes de genoma de RRV y que cada segmento está representado en estas secuencias diferencialmente.

Otra de las observaciones relevantes de este análisis fue el encontrar que el 99% de las secuencias provienen de la cadena positiva del genoma. Esta distribución no concuerda con la hipótesis de que el sustrato para la enzima Dicer sea el RNA de doble cadena que se estuviera formando cuando se replica el genoma del virus o el propio genoma viral el cual es de doble cadena, ya que de ser así esperaríamos ver representadas tanto la hebra positiva como la negativa en un porcentaje equivalente. Nuestros resultados sugieren que en las células MA104 infectadas con rotavirus, ocurrió el corte de los RNAs mensajeros virales, ya que los transcritos virales de polaridad positiva están estructurados y representan un sustrato potencial para ser procesados por Dicer.

6.6. Dinámica de la producción de los RNAs pequeños virales durante el ciclo de replicación de RRV.

Los datos obtenidos por secuenciación masiva mostraron que aproximadamente la mitad de la población de RNAs pequeños que se producen durante la infección por rotavirus corresponden a secuencias que provienen del genoma de RRV (Tabla 6.4.3). Además la mayoría de estas secuencias provienen de la cadena positiva del genoma. Para determinar la dinámica de producción de estos RNAs pequeños virales durante la infección se hicieron ensayos de PCR cuantitativo (qRT-PCRs) para microRNAs (Sección Materiales y Métodos 5.8). Estos PCRs permiten amplificar secuencias pequeñas como microRNAs y siRNAs para detectar su producción y abundancia.

Para este ensayo de PCR cuantitativo, se sintetizaron dos oligonucleótidos de los vsRNAs más abundantes (las secuencias que tuvieron el mayor número de lecturas) de la cadena positiva y la cadena negativa. En el caso de las secuencias provenientes de la cadena positiva el oligonucleótido que se mandó a sintetizar corresponde a una secuencia de 21 bases que tuvo el mayor número de lecturas (100,000) y se encuentra en el segmento 7 el cual codifica para la proteína viral NSP3. La secuencia elegida fue 5' ACTGATGAAAGACAAATTAGA 3' y va del nucleótido 445-466, y la utilizamos para representar a las secuencias virales pequeñas (vsRNAs) que se originaron de la hebra positiva. En el caso del oligonucleótido para amplificar la

secuencia de 21 bases más representada de la cadena negativa, se eligió a la secuencia de 21 bases que tuvo el mayor número de lecturas (25,000). La secuencia elegida fue: 5'GGAACAGAACTTTTAAAAGCC3' que va del nucleótido 1-21 del segmento 10 que codifica para la proteína viral NSP4, este oligonucleótido se utilizó para representar a los vsRNAs que se originaron de la hebra negativa. Los primeros qRT-PCRs (Fig. 6.6 A) nos permitieron corroborar que en la célula infectada se induce la producción de los vsRNAs y no son producidos en células sin infectar. Adicionalmente al hacer la comparación entre la abundancia de los vsRNAs de la cadena positiva y los de la cadena negativa se confirmó que los vsRNAs provenientes de la cadena positiva son mucho más abundantes que los originados de la cadena negativa (Fig. 6.6 B).

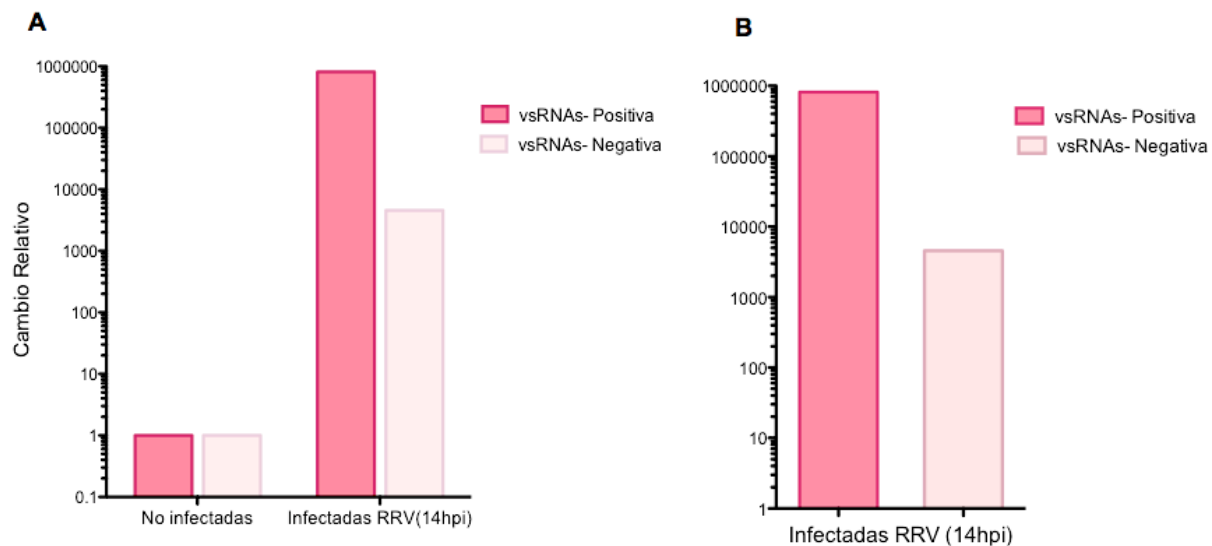


Figura 6.6. Detección de las secuencias virales pequeñas. Las células MA104 se infectaron con RRV a una MOI de 10 y 14 horas post-infección (hpi), se llevó a cabo la extracción del RNA por medio de trizol para posteriormente hacer la síntesis del cDNA de cada una de las muestras para hacer los qPCRs. El cambio relativo se determinó usando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Como control endógeno en este experimento se utilizó a U6. (A) Se muestran los datos obtenidos normalizados en base a las células no infectadas. (B) Comparación del cambio relativo de la abundancia de las secuencias virales pequeñas provenientes de la cadena positiva y de la negativa.

Ya que habíamos determinado que por medio de qRT-PCR era posible la detección de los vsRNAs en las células infectadas durante 14 horas (Fig.6.6 A), nos interesaba conocer si a horas más tempranas de la infección era posible detectar la presencia de estas secuencias virales.

Se infectaron células MA104 con RRV a una MOI de 10 ffu/célula y se hizo la extracción del RNA de las células a diferentes horas post-infección (3, 6, 9, 12 y 14 horas) para posteriormente utilizar el RNA obtenido para hacer los qRT-PCR. Encontramos que conforme transcurre la

infección las secuencias de 21 bases de la cadena positiva van aumentando, a diferencia de las secuencias de la cadena negativa que a partir de las 6 horas su abundancia se mantiene relativamente constante y no se observa un aumento significativo (Fig. 6.6.1). También los datos nos mostraron que a horas tempranas de infección como a las 3 horas post-infección, es posible la detección de vsRNAs positivos y negativos (Fig. 6.6.1), sin embargo a partir de las 6 horas post-infección la diferencia en la abundancia de las secuencias positivas y negativas empieza a ser más notable y mientras transcurren más horas de la infección esta diferencia se hace más grande. Estos ensayos mostraron que a partir de horas tempranas de la infección (3 horas) ya se está produciendo los vsRNAs y que conforme transcurre la infección en el caso de los vsRNAs que provienen de la cadena positiva su abundancia se va incrementando (Fig. 6.6.1).

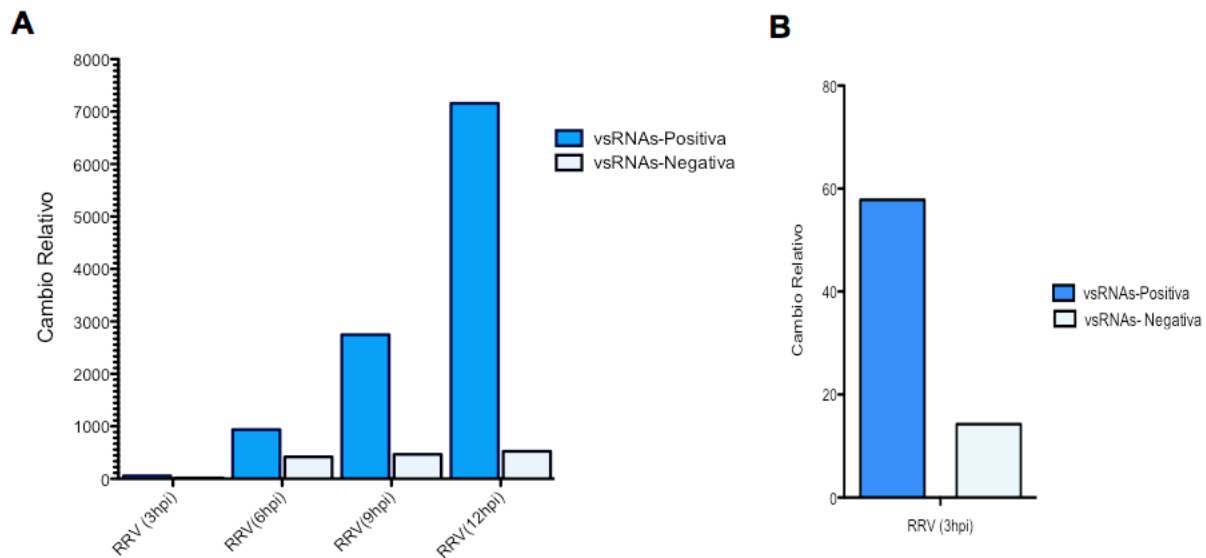


Figura 6.6.1. Detección de las secuencias virales pequeñas a diferentes tiempos de la infección. Las células MA104 se infectaron con RRV a una MOI de 10 a diferentes horas. Transcurridos los tiempos indicados se llevó a cabo la extracción del RNA por medio de trizol para posteriormente hacer los qRT-PCRs. El cambio relativo se calculó por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Como gen endógeno se utilizó Mir-103.

6.7. Caracterización de la participación de Dicer en la generación de los RNAs pequeños virales.

Nuestros resultados indicaban que durante la infección con rotavirus se producían RNAs pequeños virales (vsRNAs) virales que provenían del genoma de RRV, sin embargo no sabíamos si estos vsRNAs eran productos del corte con la proteína Dicer. Para demostrar que los vsRNAs producidos durante la infección con rotavirus correspondían a productos de Dicer, se silenció la expresión de esta proteína en células MA104 utilizando un siRNA que tiene como blanco el RNA

mensajero de Dicer. El enfoque en el que se basaron estos ensayos fue que podríamos estudiar la generación de los vsRNAs de la cadena negativa y de la cadena positiva por qRT-PCR a diferentes horas post-infección (3, 6, 9, 12 y 14 horas) en células que expresan Dicer de manera normal y células que tienen interferida la producción de Dicer, para comparar la producción de estas secuencias en las dos condiciones. Se transfectaron células MA104 con un siRNA Irrelevante que sirvió para corroborar que el efecto observado no fuera consecuencia del tratamiento con los interferentes. Otras células se transfectaron con los siRNAs de Dicer y otras sólo se trataron solamente con el medio lipofección sin siRNAs y no se infectaron (mock). Las células se infectaron con RRV a diferentes horas. La disminución de los niveles de la proteína Dicer se confirmó por medio de western blot (Fig.6.7). Las células tratadas con los siRNAs de Dicer expresaron bajos niveles de la proteína en comparación con las células tratadas con los siRNAs irrelevantes o sin los siRNAs (mock) (Fig.6.7).

Una vez que se habían obtenido células que no expresaban Dicer a diferentes horas post-infección, se aisló el RNA extraído de esas células y también se aisló el RNA de células tratadas con los siRNAs irrelevantes y las mock para hacer los qRT-PCR. Los datos obtenidos de los qRT-PCR a distintas horas post-infección mostraron cómo ocurre la dinámica de la producción de los vsRNAs (Fig.6.7.1). En ambos casos la producción de los vsRNAs que provienen de la cadena positiva y de la negativa presentan un incremento conforme avanza la infección (Fig.6.7.1). Este aumento es mucho más grande en las secuencias que vienen de la cadena positiva comparado con las que provienen de la negativa, lo cual confirma las observaciones anteriores de que las secuencias que provienen de la hebra positiva están más representadas que las secuencias que provienen de la hebra negativa.

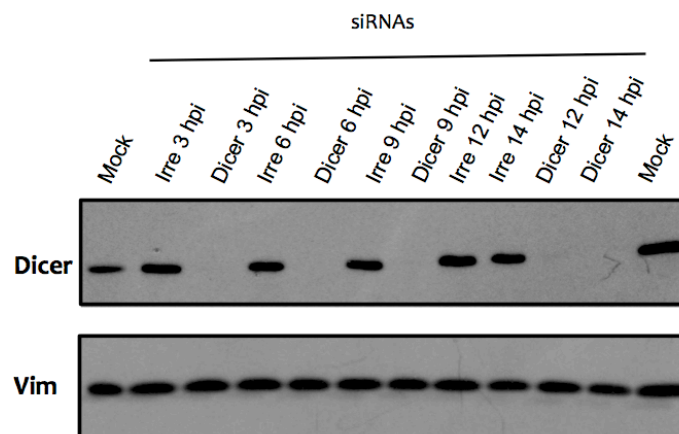


Figura 6.7. Silenciamiento de la proteína Dicer a diferentes horas post infección. Para hacer los silenciamientos se transfectaron células M4104 con los siRNAs de Dicer y siRNAs Irrelevantes utilizados a una concentración 1:20. Las células se mantuvieron 48 horas con los interferentes y después de ese tiempo se infectaron con RRV a una MOI de 10 y otras no se infectaron (mock). Las células se trataron con Magic mix y se separaron las proteínas en gel SDS-PAGE 7.5%. Para la detección de las proteínas se utilizaron los anticuerpos α -Dicer y α -Vimentina.

En las células en las que se silenció la expresión de Dicer encontramos que la abundancia relativa de los vsRNAs originados de la hebra positiva y negativa es menor comparada con la abundancia de las secuencias de células que se trataron con los siRNAs Irrelevantes. Estas observaciones sugieren que la generación de la mayoría de los vsRNAs depende de la actividad de Dicer, ya que en las células donde está ausente esta proteína la producción de estas secuencias se ve disminuida (Fig 6.7.1). En conjunto los resultados obtenidos del silenciamiento de Dicer en el análisis de la producción de los vsRNAs nos permitieron establecer que durante la infección con RRV en las células MA104, la mayoría de las secuencias de vsRNAs representan productos del corte con la proteína Dicer.

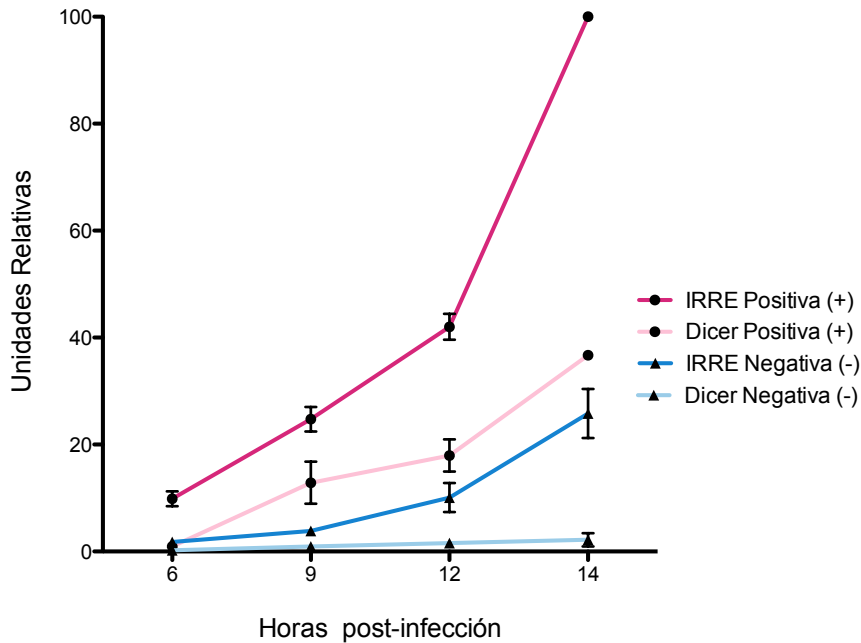


Figura 6.7.1. Cinética de la producción de los RNAs pequeños virales durante la infección por rotavirus. Los experimentos se llevaron a cabo en células MA104 que fueron infectadas con la cepa RRV de rotavirus a una MOI de 10. En las horas indicadas post-infección se hizo la extracción del RNA total con trizol para realizar los qRT-PCRs. Los valores del cambio en la abundancia relativa se obtuvieron por medio del método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Como genes de control endógeno se utilizaron el microRNA mir-103 y el RNA U6. Los resultados mostrados del qRT-PCR están normalizados en base al valor de las secuencias IRRE positiva (+) a las cuales se les asignó el valor de 100. Los datos de los qRT-PCRs representan las medias aritméticas con su desviación estándar de dos experimentos independientes.

6.8. Análisis de microRNAs celulares durante la infección por rotavirus.

Los datos obtenidos por medio de la secuenciación masiva del RNA de células infectadas y no infectadas con rotavirus durante 14 horas mostraron que cierta parte de la población de RNAs pequeños que se produce durante la infección por rotavirus proviene del genoma viral. Sin embargo el RNA que no provenía de partes del genoma viral podía representar RNAs no codificantes o microRNAs celulares. Lo primero que se hizo fue utilizar las lecturas de las muestras infectadas y no infectadas que no alinearon contra el genoma de RRV y hacer un alineamiento contra los microRNAs y RNAs no codificantes del banco de secuencias de *Macaca Mulatta*. Se utilizó *Macaca Mulatta* porque el genoma de las células MA104 no está secuenciado y *Macaca Mulatta* es el primate más parecido al Mono verde africano. El número de lecturas de las muestras infectadas y de las no infectadas que se utilizaron para hacer el alineamiento se muestran en la tabla 6.8 . El 96% de las lecturas que provenían del RNA de las muestras infectadas, y el 98% de las muestras no infectadas, alinearon contra algún microRNA o RNAs no codificantes.

Tabla 6.8. Lecturas utilizadas para hacer el alineamiento contra microRNAs celulares y RNA no codificantes de *Macaca Mulatta*.

	No. de lecturas que no mapearon contra genoma de RRV	Lecturas que mapearon contra secuencias de microRNAs y RNAs no codificantes.
Infectadas	3170817	3043983 (96%)
No Infectadas	9384265	9196579 (98%)

Las secuencias que representaban microRNAs de *Macaca Mulatta* se seleccionaron y se eliminaron las que habían alineado con RNAs no codificantes. De los microRNAs detectados 261 microRNAs estaban presentes en las dos condiciones (infectadas y no infectadas), 10 microRNAs sólo estaban en las células infectadas y 26 en las no infectadas (Fig.6.8.1).

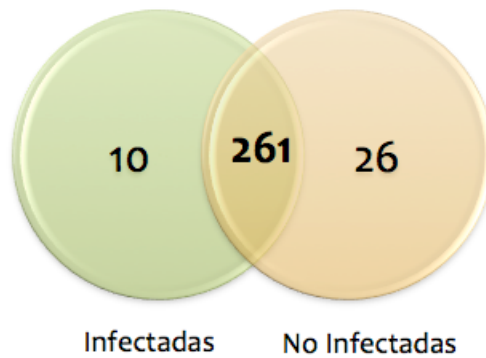


Figura 6.8.1. MicroRNAs celulares de *Macaca Mulatta*. Número de microRNAs compartidos en las dos condiciones y microRNAs exclusivo de cada condición.

Los resultados que se generaron después de hacer la selección de los microRNAs mostraron que la mayoría de los microRNAs que están caracterizados para *Macaca Mulatta* se comparten en ambas condiciones, aquellos que se encontraron exclusivamente en una de las condiciones tenían muy pocas lecturas (menos de cinco), por lo que decidimos no estudiarlos ya que estaban muy poco representados. Decidimos analizar la abundancia relativa de los microRNAs que se compartían en las dos condiciones, con la idea de establecer si existían diferencias significativas en la cantidad relativa de algunos de estos microRNAs, comparando ambas condiciones. Dado que para hacer el alineamiento se inició con un número distinto de lecturas para cada condición, lo primero que se hizo fue normalizar los datos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Normalizar} = \frac{\text{Número de lecturas del microRNA}}{\text{Número total de lecturas de la condición}}$$

Una vez normalizados los datos obtuvimos una lista de microRNAs (Tabla 6.8.2) ordenados de mayor a menor número de lecturas. Encontramos que el microRNA con mayor número de lecturas en ambos casos fue el mir-21. Algunos miembros de la familia de let-7 también son de los más abundantes en las dos condiciones. El mir-378 es el segundo más abundante en células infectadas, sin embargo no aparece en las no infectadas. El mir-30e es el décimo microRNA más abundante en las células no infectadas pero no está en las infectadas. Estas diferencias en la

abundancia de los microRNAs mostraron que existen microRNAs celulares que podrían estar expresándose de manera distinta dependiendo si las células están o no infectadas.

Tabla 6.8.2. MicroRNAs celulares más abundantes en células infectadas y células no infectadas.

INFECTADAS			NO INFECTADAS		
MicorRNA	No. de Lecturas	Abundancia Relativa (%)	MicorRNA	No. de Lecturas	Abundancia Relativa (%)
mml-mir-21	739610	30.43731442	mml-mir-21	2808059	32.51725011
mml-mir-378	250528	10.31002759	mml-mir-30a	826687	9.573013936
mml-mir-148a	224505	9.239098004	mml-mir-148a	759124	8.790636155
mml-let-7f-2	187391	7.711738332	mml-let-7f-2	725970	8.406713698
mml-let-7f-1	171061	7.03970666	mml-mir-378	697885	8.08149013
mml-let-7e	83986	3.456292221	mml-let-7f-1	697047	8.071786111
mml-mir-30a	59475	2.447586262	mml-let-7a-2	249512	2.889342464
mml-let-7a-2	45910	1.889343174	mml-let-7a-1	248321	2.875550715
mml-let-7a-1	45570	1.875351088	mml-let-7a-3	243242	2.816736027
mml-let-7a-3	43827	1.80362107	mml-mir-30e	96194	1.113924015

6.9. Estudio de expresión diferencial de microRNAs celulares durante la infección por rotavirus.

Para poder determinar si existía expresión diferencial de microRNAs celulares en células infectadas y no infectadas, se hizo un estudio de expresión diferencial con el programa NOISeq. El programa NOISeq considera que un microRNA presenta una expresión diferencial cuando el número de lecturas entre dos condiciones tiene una diferencia o cambio que es estadísticamente significativo, para obtener este valor calcula la probabilidad usando la siguiente fórmula: $q = \Pr(\text{valor de expresión diferencial}) / \Pr(\text{valor de expresión no diferencial})$ si el valor de q es mayor a 0.8 considera que es estadísticamente significativo y por lo tanto el microRNA se expresa diferencialmente.

El programa considera un enfoque no paramétrico. No contábamos con un replicado biológico, pero el programa NOISeq-sim simula un replicado. Por medio del método descrito en la sección Materiales y Métodos 5.10 el programa obtuvo los valores de expresión de los microRNAs. El análisis con NOI-seq mostró que habían microRNAs celulares que se expresaban más en las células infectadas comparados con las células no infectadas (Fig.6.9 A). También se identificaron

otros microRNAs que se expresaban más en las células no infectadas en comparación con las infectadas (Fig.6.9B), y por último se encontraron microRNAs que tuvieron los mismos niveles de expresión en las dos condiciones (Fig.6.9C)

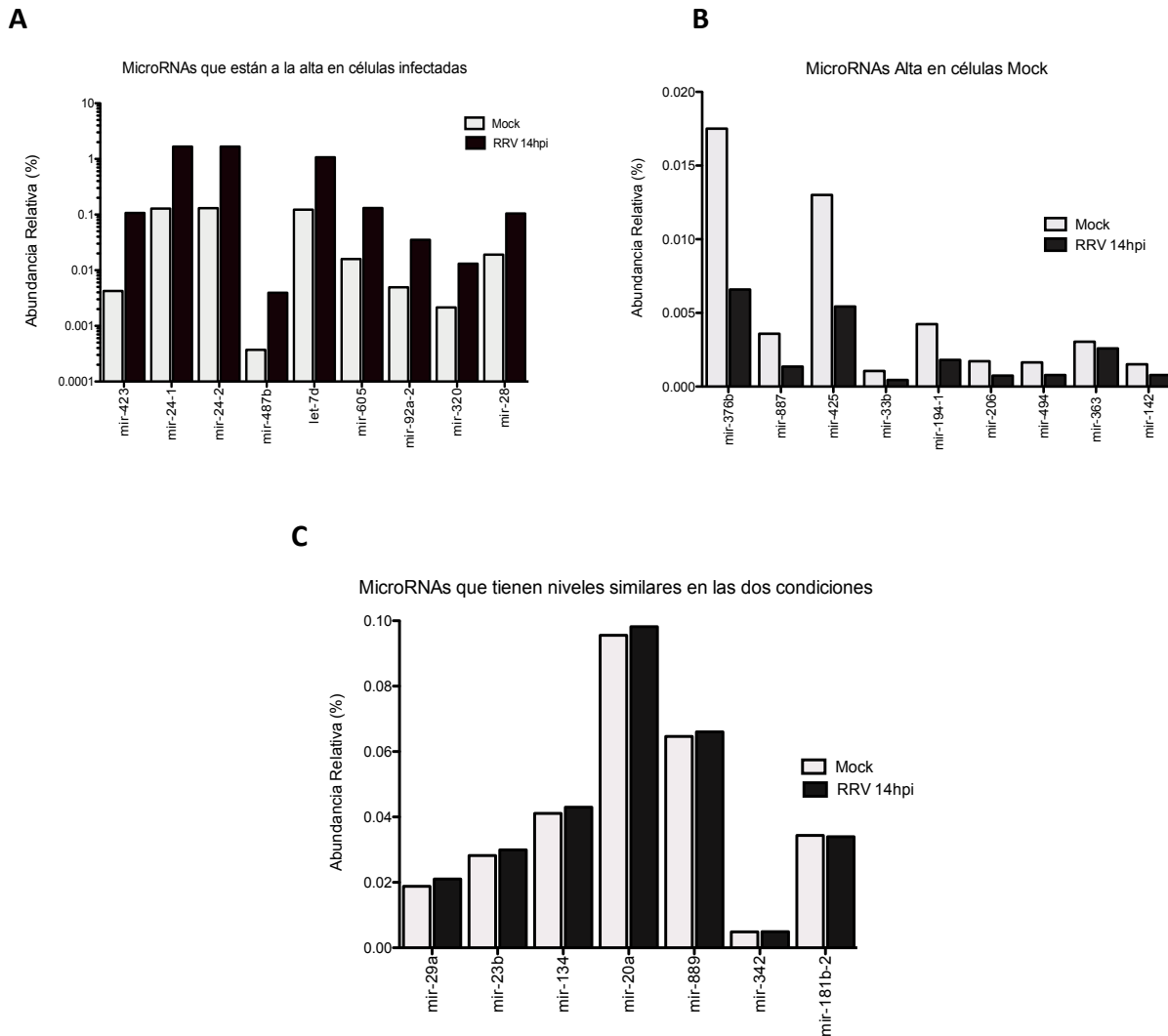


Figura 6.9. Análisis de expresión diferencial de los microRNAs . (A), (B) .Se muestran los microRNAs celulares que presentan expresión diferencial en alguna de las condiciones. (C) Los microRNAs que tienen un nivel de expresión similar en las células infectadas y en las no infectadas.

No hemos caracterizado el posible papel que pudieran tener estos microRNAs en la infección por rotavirus pero los datos obtenidos muestran que existen ciertos micorRNAs celulares que se expresan de manera distinta cuando las células están infectadas conrotavirus. Se pretende

hacer una búsqueda de los microRNAs celulares que pudieran tener alguna relación con la respuesta inmune, caracterizar sus blancos y determinar su implicación en la respuesta inmune contra la infección por rotavirus.

7. DISCUSIÓN

En plantas, hongos e invertebrados ya se ha corroborado la participación del RNAi en el establecimiento del estado antiviral, pero aun no se ha demostrado que la vía del RNAi pudiera tener un papel activo en montar una respuesta contra los virus en los mamíferos [45]. En la vía del RNAi participan diferentes proteínas celulares como Drosha, Dicer y proteínas de la familia de las Argonautas. Dicer es una proteína citoplásmica que corta dsRNA generando RNAs pequeños que miden entre 20-25 bases. Uno de los enfoques que se ha utilizado en la búsqueda de la participación de la vía del RNAi en la respuesta inmune contra los virus, ha sido la identificación de RNAs pequeños virales (vsRNAs) que puedan ser productos de corte de RNAsas tipo III como Dicer. Considerando que Dicer es una RNasa tipo III que está en el citoplasma celular y que tiene como sustrato al dsRNA, nos propusimos a determinar si en las células infectadas con rotavirus se producían RNAs pequeños derivados del RNA viral. En el presente trabajo encontramos que en las células MA104 infectadas con RRV hay una acumulación de RNAs pequeños que no se observó en células sin infectar (Fig 6.3). Debido a que los RNAs pequeños identificados podrían ser celulares o virales realizamos un análisis de secuenciación masiva y estudios de alineamiento que mostraron que la mitad de las secuencias de RNAs pequeños producidos en las células infectadas con rotavirus se generaron del genoma viral. En las células no infectadas un porcentaje muy bajo (0.06%) alineó con regiones del genoma de RRV lo cual podría representar o secuencias virales muy conservadas en el genoma de primates o una contaminación durante la extracción del RNA, aunque estas posibilidades se tendrían que analizar mas cuidadosamente. Una posibilidad es buscar esas secuencias en otros genomas de primates para ver si están muy conservadas.

Los RNAs pequeños que no alinearon contra el genoma de RRV representan secuencias de RNAs no codificantes y microRNAs celulares (Tabla 6.8). Es importante mencionar que aunque no conocemos la función que pudieran tener los RNAs no codificantes, no podemos descartar que tengan un papel regulatorio en la expresión de genes. Por lo tanto es de gran interés estudiar con mayor detalle estos RNAs con la finalidad de relacionarlos con algún tipo de señalización que se activa durante la infección.

Uno de los hallazgos relevantes de este trabajo es el haber encontrado por medio de la realización de los análisis de cobertura que los once segmentos que componen el genoma de RRV estaban representados en los RNAs pequeños virales (vsRNAs). La mayoría de los vsRNAs (99%) provenían de la hebra positiva del genoma y un 1% de la cadena negativa. Estos resultados sugieren que la mayor parte de los sustratos de Dicer en las células infectadas con RRV no son intermediarios de replicación o RNA genómico, porque las dos cadenas no están representadas de manera equivalente, por lo tanto hemos propuesto que los vsRNAs producidos provienen de RNAs mensajeros virales altamente estructurados. Esta propuesta se basa en diferentes observaciones ya reportadas donde se han estudiado las características que presentan de los mensajeros virales de rotavirus. La predicción de la estructura secundaria de los RNAs mensajeros de rotavirus ya ha sido caracterizada [32]. En el trabajo realizado por Li *et al.* 2010, se hizo un análisis de predicción de plegamiento de RNA por medio del programa RNA fold para determinar como se estructuran los mensajeros de varias cepas de rotavirus. Lo que encontraron fue que los 11 transcritos de rotavirus presentan regiones que forman estructuras secundarias muy conservadas dentro de los 11 segmentos, estas regiones principalmente se encuentran los extremos 3' y 5'. El análisis que hicimos de cobertura mostró que en varios de los segmentos (1, 2, 4, 8, 9 y 10) los extremos tienen muchas lecturas lo cual en parte concuerda con la observación de que en los extremos hay regiones que tienden a formar preferentemente estructuras secundarias y además estas son muy conservadas.

Otra de las observaciones que apoya la propuesta de que los vsRNAs que identificamos provienen de mensajeros virales, se basa en estudios previos del laboratorio realizado por Ayala-Bretón *et. al*; 2009, en el cual por medio de qRT-PCRs de células infectadas con RRV, se midió la abundancia de ciertos mensajeros virales y la abundancia del RNA de doble cadena. Se encontró que en las células infectadas con rotavirus existe siempre una mayor cantidad de RNAs mensajero virales que el RNA de doble cadena, específicamente a las 12 horas post-infección había seis veces más RNAs mensajeros virales que RNA de doble cadena y conforme transcurre la infección esta diferencia se hace cada vez mayor aumentando la proporción de los mensajeros virales [5]. Estas observaciones concuerdan en el hecho de encontramos que a las 14 horas post-infección la mayor parte del RNA de las células infectas representa RNAs de

polaridad positiva y sólo existe una pequeña población que pudieran ser intermediarios de replicación y por eso se ha propuesto que el 99% de los vsRNAs que se producen a 14 horas de infección son productos del corte de mensajeros virales y el 1% de los vsRNAs podrían ser intermediarios de replicación.

El papel de Dicer durante la respuesta antiviral ya se ha caracterizado en algunos virus en células de mamíferos. En el trabajo de Matskevich *et al.* 2007 encontraron que en células infectadas con el virus de influenza A, la producción de Dicer se inhibe debido a la infección aunque no determinaron el mecanismo por el cual el virus pudiera llevar a cabo esta regulación. En nuestros resultados encontramos que la proteína Dicer se mantiene presente durante la infección, aunque presenta una disminución conforme transcurre la infección. La disminución de los niveles de Dicer podría ser consecuencia del efecto que causa la infección con rotavirus al disminuir las proteínas celulares. Dicer podría representar una de las proteínas de las que se inhibe su traducción al infectarse la célula. Es importante mencionar que se podría estudiar si existe algún componente o proteína viral que pudiera estar regulando esta disminución de Dicer ya que por lo observado en los datos de silenciamiento de Dicer, al medir la infectividad y el rendimiento viral los niveles bajos de la proteína Dicer favorecen la infección del virus, por lo tanto podría ser que el virus controlara la disminución de Dicer para favorecer la infección.

Los datos obtenidos del aumento de la infectividad y el rendimiento viral en ausencia de Dicer sugieren que esta proteína tiene una contribución en la respuesta antiviral. El incremento observado es de dos veces, lo cual indica que aunque esta proteína tiene una participación en la respuesta antiviral, no es el único mecanismo en el que se basa la respuesta inmune de la célula contra infección de rotavirus, ya que de ser así al quitar la proteína Dicer la infección y el rendimiento viral hubieran tenido un incremento más grande al que observamos. El mecanismo por el cual Dicer pudiera estar limitando la infección aún no lo hemos caracterizado pero en base a los datos obtenidos se propone que quizás Dicer al estar cortando los RNAs mensajeros de rotavirus podría disminuir la traducción de proteínas virales. Esto podría estudiarse analizando la producción de proteínas virales en células que expresen Dicer de manera normal y células que tuvieran silenciada Dicer.

En este trabajo también logramos determinar si la producción de los vsRNAs era dependiente del corte con Dicer. Encontramos que en ausencia de Dicer la producción de los vsRNAs se ve disminuida a más del doble comparada con las células que tienen los niveles de Dicer normales. Estos datos confirmaron que la mayoría de los vsRNAs son productos del corte con Dicer, sin embargo los vsRNAs que se siguen produciendo podrían ser productos del corte con otras proteínas como la de la familia de la Argonautas (AGO), ya que se sabe que esta proteínas tienen la capacidad de cortar RNA de doble cadena y además ya se ha caracterizado que participan en el corte de dsRNAs para producir microRNAs por una ruta que se ha denominado no dependiente de Dicer [50].

Por último el análisis de los microRNAs celulares, nos ha permitido conocer que en las células MA104 existen microRNAs celulares que se encuentran expresados de manera diferencial en células infectadas y células que no están infectadas. Aún falta por caracterizar estos microRNAs para saber sus posibles blancos y funciones para saber si alguno de ellos puede contribuir de manera activa en la respuesta antiviral. Se pretende hacer una búsqueda de los microRNAs que tuvieran alguna relación con la respuesta inmune, caracterizar sus blancos y determinar su implicación en la respuesta inmune contra la infección por rotavirus.

8. CONCLUSIONES

- ☆ Durante la infección con RRV se generan RNAs pequeños virales (vsRNAs) que provienen principalmente de los transcritos virales. Los vsRNAs representan los once segmentos del genoma de RRV.

- ☆ Dicer es la responsable de la producción de la mayoría de los vsRNAs identificados, ya que en su ausencia, disminuye la producción de estas secuencias.

- ☆ La actividad de Dicer tiene una contribución en la respuesta antiviral de la célula, ya que en su ausencia la infectividad y el rendimiento viral aumentan.

- ☆ Durante la infección por rotavirus existen microRNAs celulares que podría cambiar sus niveles de expresión dependiendo si las células están o no infectadas con RRV.

9. REFERENCIAS

1. Aliyari, R. & Ding, S.-W. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunological reviews* **227**, 176–88 (2009).
2. Ando, Y. *et al.* Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER. *BMC molecular biology* **12**, 6 (2011).
3. Angel, J., Franco, M. a & Greenberg, H. B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 529–39 (2007).
4. Arnold, M. M. & Patton, J. T. Rotavirus antagonism of the innate immune response. *Viruses* **1**, 1035–56 (2009).
5. Ayala-Breton, C. *et al.* Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *Journal of virology* **83**, 8819–31 (2009).
6. Barchet, M. S. W. & Hartmann, V. H. G. Beyond Double-Stranded RNA-Type I IFN Induction by 3pRNA and Other Viral Nucleic Acids History of Type I IFN Induction. **1**, 207–230 (2007).
7. Bartel, D. P., Lee, R. & Feinbaum, R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. **116**, 281–297 (2004).
8. Bennasser, Y. *et al.* Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nature structural & molecular biology* **18**, 323–7 (2011).
9. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–55 (2009).
10. Cullen, B. R. Viruses and microRNAs. *Nature genetics* **38 Suppl**, S25–30 (2006).
11. Cullen, B. R. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* **457**, 421–5 (2009).
12. Ding, S.-W. RNA-based antiviral immunity. *Nature reviews. Immunology* **10**, 632–44 (2010).
13. Ding, S.-W. & Lu, R. Virus-derived siRNAs and piRNAs in immunity and pathogenesis. *Current opinion in virology* **1**, 533–44 (2011).
14. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics* **9**, 102–14 (2008).

15. Gan, J. *et al.* Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Cell* **124**, 355–66 (2006).
16. Gantier, M. P. & Williams, B. R. G. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine & growth factor reviews* **18**, 363–71 (2007).
17. Ghosh, Z., Mallick, B. & Chakrabarti, J. Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction. *Nucleic acids research* **37**, 1035–48 (2009).
18. Gitlin, L. & Andino, R. MINIREVIEW Nucleic Acid-Based Immune System : the Antiviral Potential of Mammalian RNA Silencing. **77**, 7159–7165 (2003).
19. Gottwein, E. & Cullen, B. R. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell host & microbe* **3**, 375–87 (2008).
20. Grundhoff, A. & Sullivan, C. S. Virus-encoded microRNAs. *Virology* **411**, 325–43 (2011).
21. Gutiérrez, M. *et al.* Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology* **84**, 9161–9 (2010).
22. Hammond, S. M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS letters* **579**, 5822–9 (2005).
23. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics* **5**, 522–31 (2004).
24. Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Current opinion in virology* **2**, 380–8 (2012).
25. Jeang, K.-T. RNAi in the regulation of mammalian viral infections. *BMC biology* **10**, 58 (2012).
26. Jinek, M. & Doudna, J. a A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**, 405–12 (2009).
27. Katze, M. G., He, Y. & Gale, M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature reviews. Immunology* **2**, 675–87 (2002).
28. Ketting, R. F. The many faces of RNAi. *Developmental cell* **20**, 148–61 (2011).
29. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 376–85 (2005).

30. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 126–39 (2009).
31. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* **10**, R25 (2009).
32. Li, W. *et al.* Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions. *Nucleic acids research* **38**, 7718–35 (2010).
33. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 402–8 (2001).
34. López, S. & Arias, C. F. Rotavirus-host cell interactions: an arms race. *Current opinion in virology* **2**, 389–98 (2012).
35. MacMicking, J. D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature reviews. Immunology* **12**, 367–82 (2012).
36. MacRae, I. J., Zhou, K. & Doudna, J. a Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature structural & molecular biology* **14**, 934–40 (2007).
37. Macrae, I. J. *et al.* Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science (New York, N.Y.)* **311**, 195–8 (2006).
38. Matskevich, A. a & Moelling, K. Dicer is involved in protection against influenza A virus infection. *The Journal of general virology* **88**, 2627–35 (2007).
39. McDonald, S. M. & Patton, J. T. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in microbiology* **19**, 136–44 (2011).
40. Molnár, A. *et al.* Plant Virus-Derived Small Interfering RNAs Originate Predominantly from Highly Structured Single-Stranded Viral RNAs Plant Virus-Derived Small Interfering RNAs Originate Predominantly from Highly Structured Single-Stranded Viral RNAs †. (2005).doi:10.1128/JVI.79.12.7812
41. Müller, S. & Imler, J.-L. Dicing with viruses: microRNAs as antiviral factors. *Immunity* **27**, 1–3 (2007).
42. Nair, V. & Zavolan, M. Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends in microbiology* **14**, 169–75 (2006).
43. O'Neill, L. a, Sheedy, F. J. & McCoy, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* **11**, 163–75 (2011).

44. Oshlack, A., Robinson, M. D. & Young, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome biology* **11**, 220 (2010).
45. Parameswaran, P. *et al.* Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS pathogens* **6**, e1000764 (2010).
46. Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S. & Glass, R. I. Severe Childhood Diarrhea. **12**, 304–306 (2006).
47. Park, J.-E. *et al.* Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* **475**, 201–5 (2011).
48. Pedersen, I. M. *et al.* Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* **449**, 919–22 (2007).
49. Peltier, H. J. & Latham, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA (New York, N.Y.)* **14**, 844–52 (2008).
50. Pfeffer, S. RNA silencing as a natural antiviral defense system in mammals: where are we now? *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 871–2 (2010).
51. Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 23–36 (2007).
52. Rojas, M., Arias, C. F. & López, S. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *Journal of virology* **84**, 10457–66 (2010).
53. Russo, A. & Potenza, N. Antiviral effects of human microRNAs and conservation of their target sites. *FEBS letters* **585**, 2551–5 (2011).
54. Sadler, A. J. & Williams, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews. Immunology* **8**, 559–68 (2008).
55. Sashital, D. G. & Doudna, J. a Structural insights into RNA interference. *Current opinion in structural biology* **20**, 90–7 (2010).
56. Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N. & Harrison, S. C. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO journal* **30**, 408–16 (2011).
57. Shimakami, T. *et al.* Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 941–6 (2012).

58. Silverman, R. H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of virology* **81**, 12720–9 (2007).
59. Skalsky, R. L. & Cullen, B. R. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annual review of microbiology* **64**, 123–41 (2010).
60. Song, L., Liu, H., Gao, S., Jiang, W. & Huang, W. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *Journal of virology* **84**, 8849–60 (2010).
61. Takeshita, D. *et al.* Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer. *Journal of molecular biology* **374**, 106–20 (2007).
62. Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A. & Conesa, A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome research* **21**, 2213–23 (2011).
63. Tomari, Y. & Zamore, P. D. Perspective: machines for RNAi. *Genes & development* **19**, 517–29 (2005).
64. Trask, S. D., McDonald, S. M. & Patton, J. T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 165–77 (2012).
65. Trask, S. D., Ogden, K. M. & Patton, J. T. Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Current opinion in virology* **2**, 373–9 (2012).
66. Trujillo-Alonso, V., Maruri-Avidal, L., Arias, C. F. & López, S. Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *Journal of virology* **85**, 12594–604 (2011).
67. Welker, N. C. *et al.* Dicer's helicase domain discriminates dsRNA termini to promote an altered reaction mode. *Molecular cell* **41**, 589–99 (2011).
68. Wu, Q., Wang, X. & Ding, S.-W. Viral suppressors of RNA-based viral immunity: host targets. *Cell host & microbe* **8**, 12–5 (2010).
69. Yan, N. & Chen, Z. J. Intrinsic antiviral immunity. *Nature immunology* **13**, 214–22 (2012).
70. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. & Stewart, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics* **7**, 85 (2006).