



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Rotavirus media la degradación de IFITM 2/3 inducida por IFN tipo I

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Alma Delia Valencia Camargo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Susana López Charretón (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres (CINVESTAV-IPN)

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva (IBT-UNAM)

Instituto de Biotecnología

Ciudad de México, mayo, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Jurado**

Presidente	Dra. Leonor Pérez Martínez
Secretario	Dra. Denhi Schnabel Peraza
Vocal	Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano
Vocal	Dr. Luis Cárdenas Torres
Vocal	Dr. Ramón Gonzalez García-Conde

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto contó con el apoyo de los donativos de DGAPA-UNAM (IG-200114) y del CONACyT (153639). La alumna contó con la beca otorgada por el CONACyT (594685) y con el apoyo del PAEP para asistir al IX Congreso Nacional de Virología.

*“Somos lo que hacemos día a día. De modo que la excelencia no es un acto, sino un hábito”.*

*-Aristóteles-*

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado”.*

*-Albert Szent-*

## *Dedicatorias*

*A mis papás, Imelda y Carlos. Por ser unos maravillosos padres, por su amor infinito y su apoyo incondicional. Gracias a ustedes soy la persona que soy. Son mi ejemplo de superación.*

*A mis hermanos Maribel, Carlos, Araceli y Edí. Por escucharme, por orientarme y por hacerme reír con sus ocurrencias, muy similares a las mías. Admiro todo lo que hacen día a día para lograr sus metas.*

*A mis sobrinos, Javi y Leo, por regalarme una infinidad de momentos divertidos y de cariño.*

*Es cierto que la familia no se elige, pero yo estoy más que agradecida de que estén en mi vida.*

*¡Gracias totales!*

## *Agradecimientos*

*A la Dra. Susana López, por dirigir este proyecto, ampliando mi visión y fomentando mi capacidad crítica. Por su apoyo personal y profesional.*

*A las Dras. Rosa María del Ángel, Lorena Gutiérrez y Denhi Schnabel; así como a los Dres. Gustavo Pedraza, Ramón González y Luis Cárdenas. Por sus valiosas aportaciones a este trabajo.*

*Al Dr. Marco Díaz por ser el pilar que me mantuvo de pie en muchas ocasiones. Por todas las asesorías, las preguntas y las confesiones personales. También a Yvette porque en ella encontré una amistad sincera y desinteresada. Son los mejores padres adoptivos que pude tener. Ambos son de lo mejor que me llevo de Cuernavaca.*

*A Vero, quien viene conmigo desde antes y, por fortuna, la vida nos hizo volver a coincidir para compartir esta aventura; eres el ejemplo de que los amigos están en los buenos y en los malos momentos. A Manuel, por compartir excelentes momentos, por las risas y por enseñarme a darle importancia solamente a aquello que lo merece. Gracias a ambos por su amistad tan “gravy”.*

*A Oscar, por el apoyo incondicional, por enseñarme que puedo transformarme cuando estoy con él pero sin dejar de ser yo. Por su constante motivación. Por levantarme. Por hacerme crecer como profesional y como persona. Por las discusiones intelectuales que sólo con él puedo tener. Por ser mi fan número uno.*

*A mis amigos de generación: Osvaldo (por esas charlas nocturnas. Nunca podré dejar de decirle Doctor), Laura (una excelente roomie), Ángel (el niño que me sacaba canas verdes pero que desarrolló mi paciencia) y Wendy (la madura del grupo). Por todos los momentos compartidos, las pláticas y las risas. Por ser mi válvula de escape en muchas ocasiones.*

*A Jhon, quien está a kilómetros de distancia pero sigue siendo como si estuviera a mi lado porque siempre está dispuesto a escucharme, platicar, apoyarme y hacerme reír. Eres mi yo pero en hombre. Has sido y sigues siendo mi inspiración en muchos sentidos.*

*A la UNAM, por seguir formándome como persona y como profesional. Porque pocas cosas se comparan con el orgullo de ser universitario, de ser parte de la máxima casa de estudios.*

*A los miembros del grupo Arias/López por sus enseñanzas y apoyo recibidos durante la realización de esta tesis. En especial al Dr. Tomás López, por su disposición para ayudarme; así como a Giovaní, Joaquín y Luis.*

*A las personas que con su excelente trabajo aligeraron esta travesía: Nalle, doña Lore, Adrián, Toño y Gloria.*

# Índice

Resumen.....	4
Introducción .....	5
Rotavirus.....	5
Ciclo replicativo de rotavirus.....	6
Respuesta inmune innata a la infección por rotavirus.....	9
Respuesta mediada por el Interferón de tipo I.....	10
Proteínas transmembranales inducibles por interferón (IFITMs).....	11
Defensa de rotavirus contra la inmunidad innata.....	13
NSP1 como antagonista de IFN tipo I.....	14
Antecedentes .....	17
Hipótesis .....	19
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares .....	20
Materiales y métodos.....	21
Esquema general de trabajo .....	21
Líneas celulares y cepas virales.....	24
Anticuerpos, reactivos y plásmidos .....	24
Incubación de células con IFN tipo I.....	25
Evaluación de la infectividad mediante el ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa.....	25
Transfección de plásmidos.....	26
Ensayos de inmunofluorescencia .....	26
Transfección de RNAs pequeños de interferencia (siRNAs).....	27
Evaluación del nivel de IFITM 1, IFITM 2/3, RNasa L o PKR.....	27
Resultados.....	29
La susceptibilidad de rotavirus a IFN tipo I está asociada a la proteína VP4. ....	29
IFITM 2/3 se induce en las células MA104 por el tratamiento con IFN tipo I de manera dependiente del tiempo. ....	30
La sobreexpresión de IFITM 3 afecta diferencialmente la infectividad de RRV y de UK. ....	31



La infección con RRV o UK no induce la expresión de IFITM 2/3.....	32
La infección con RRV disminuye el nivel de IFITM 2/3 inducida por el IFN tipo I.....	33
RRV disminuye significativamente el nivel de IFITM 2/3 en comparación con UK a partir de las 6 horas post-infección.....	34
El silenciamiento de la proteína no estructural NSP1 incrementa el nivel de IFITM 2/3 durante la infección con RRV.....	38
La inducción de la degradación de IFITM 2/3 correlaciona con el origen del gen NSP1 de rotavirus.....	39
La incapacidad de la NSP1 de UK de inducir la degradación de IFITM 2/3 no está asociada al nivel de proteína viral.....	41
RRV y UK no provocaron una disminución en el nivel de RNasa L y PKR.....	43
Discusión .....	46
Modelos del diferente control de las cepas RRV y UK de rotavirus sobre la respuesta mediada por IFN tipo I, con base en los resultados del presente trabajo.....	50
Conclusiones.....	53
Perspectivas.....	54
Referencias .....	55
Anexo I.....	59

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> La cápside de los rotavirus consta de 3 capas de proteínas que contienen al genoma viral (representación de una criomicroscopía electrónica).....	5
<b>Figura 2.</b> Ciclo replicativo de los rotavirus.....	9
<b>Figura 3.</b> Reconocimiento de los rotavirus y respuesta inmune innata mediada por IFN I.....	11
<b>Figura 4.</b> Estructura de las IFITMs.....	12
<b>Figura 5.</b> La NSP1 de los rotavirus es la proteína más variable y su estructura sugiere una función de ubiquitín ligasa E3.....	15
<b>Figura 6.</b> El IFN tipo I disminuye la infectividad de la cepa UK pero no la de la cepa RRV.....	17
<b>Figura 7.</b> La susceptibilidad a IFN tipo I está asociada con la proteína VP4.....	30
<b>Figura 8.</b> El tratamiento con IFN tipo I induce la expresión de IFITM 2/3.....	30
<b>Figura 9.</b> El tratamiento con IFN tipo I no induce la expresión de IFITM 1 en células MA104.....	31
<b>Figura 10.</b> La infectividad de UK es más susceptible a la sobreexpresión de la IFITM 3 que la de RRV.....	32
<b>Figura 11.</b> La infección con RRV o UK no induce la expresión de IFITM 2/3 en células MA104.....	27
<b>Figura 12.</b> La infección con RRV disminuye el nivel de IFITM 2/3 inducida por IFN tipo I.....	34
<b>Figura 13.</b> La infección con RRV disminuye el nivel de IFITM 2/3 inducida por IFN tipo I desde las 6 h.p.i.....	35
<b>Figura 14.</b> El tratamiento con MG132 revierte la disminución del nivel de IFITM 2/3 que se observa durante la infección con RRV.....	37
<b>Figura 15.</b> El silenciamiento de NSP1 incrementa el nivel de IFITM 2/3 durante la infección con RRV.....	39
<b>Figura 16.</b> La capacidad de degradación de IFITM 2/3 segrega con el gen <i>NSP1</i> .....	41
<b>Figura 17.</b> La síntesis y el nivel total de proteínas virales no correlaciona con la capacidad de degradar IFITM 2/3.....	43
<b>Figura 18.</b> El nivel de NSP1 de UK no correlaciona con la capacidad de degradar IFITM 2/3.....	43
<b>Figura 19.</b> El nivel de RNasa L no se modifica durante la infección con RRV o UK.....	45
<b>Figura 20.</b> El nivel de PKR no se modifica durante la infección con RRV o UK.....	45
<b>Figura 21.</b> Efectos del IFN tipo I durante la infección de RRV.....	51
<b>Figura 22.</b> Efectos del IFN tipo I durante la infección de RRV.....	52

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Función de las proteínas no estructurales de rotavirus. ....	6
<b>Tabla 2.</b> Blancos de degradación de NSP1 de algunas cepas de rotavirus.....	16
<b>Tabla 3.</b> Fenotipo de las rearreglantes utilizadas y sus cepas parentales.....	40

## Abreviaturas

<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>β-TrCP</b>	Proteína que contiene repetidos de transducina beta
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol (sonda que forma complejos fluorescentes con regiones de DNA ricas en A-T)
<b>DLP</b>	Partícula de doble capa
<b>DMEM</b>	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HCV</b>	Virus de la hepatitis C
<b>HIV-1</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana 1
<b>hsc70</b>	Proteína constitutiva de choque térmico 70
<b>IFITM</b>	Proteína transmembranal inducible por interferón
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IFNAR</b>	Receptor de Interferón tipo I
<b>IRF</b>	Factor de respuesta a Interferón
<b>ISG</b>	Genes estimulados por IFN
<b>ISRE</b>	Elementos de respuesta estimulados por IFN
<b>JAK</b>	Cinasas de Janus
<b>MAVS</b>	Proteína de señalización antiviral mitocondrial
<b>MDA-5</b>	Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5 (sensor de dsRNA)
<b>MEM</b>	Minimum Essential Medium
<b>MG132</b>	Carbobenzoxi-Leu-Leu Leucinal (inhibidor del proteasoma)
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>OAS</b>	2'5'-oligoadenilato sintetasa
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos
<b>PKR</b>	Proteín cinasa R
<b>RNasa L</b>	Ribonucleasa L
<b>RIG-1</b>	Gen inducible por ácido retinoico 1 (sensor de dsRNA)
<b>SARS</b>	Síndrome respiratorio agudo severo
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>siRNA</b>	RNA de interferencia pequeño
<b>ssRNA</b>	RNA de cadena sencilla
<b>STAT</b>	Transductores de señales y activadores de la transcripción
<b>TLP</b>	Partícula de triple capa
<b>TLR3</b>	Receptor tipo Toll 3
<b>UI</b>	Unidades internacionales



## Resumen

Los rotavirus son los principales agentes causales de diarrea severa y deshidratación infantil, causando la muerte de 453 000 niños menores de 5 años en el mundo<sup>[49, 50]</sup>. Durante la infección con rotavirus, las células pueden detectar la presencia del virus y desencadenar varios mecanismos de defensa antiviral. Una de las respuestas más importantes es la mediada por el IFN de tipo I. El IFN tipo I es un primer mensajero que al unirse a su receptor regula la transcripción de más de 1 000 genes con funciones antivirales<sup>[14]</sup>. Entre los genes estimulados por IFN se encuentran las proteínas transmembranales inducibles por IFN (IFITMs)<sup>[6]</sup>. Recientemente se ha encontrado que las IFITMs (IFITM 1, IFITM 2 y IFITM 3) son capaces de inhibir la entrada de virus como HIV, SARS, ébola, influenza y reovirus<sup>[1, 7, 9, 11, 22, 40]</sup>, gracias a su localización en las membranas plasmática y endosomal<sup>[60]</sup>. A pesar de la gran cantidad de mecanismos virales que existen para evadir la respuesta inmunológica, se conocen pocos ejemplos de virus capaces de modular a las IFITMs<sup>[10]</sup>. En este trabajo, encontramos que rotavirus es capaz de disminuir el nivel de IFITM 2/3 en forma cepa-dependiente: la cepa de simio, RRV, provoca una disminución en la acumulación de dichas proteínas, mientras que la cepa bovina, UK, no es capaz de modular la cantidad de IFITM 2/3. Los ensayos con rearrreglantes virales entre UK y RRV, indicaron que el fenotipo de disminución del nivel de IFITM 2/3 segrega con el gen que codifica para NSP1, a la cual se le ha atribuido la función de inducir la degradación a varias proteínas celulares. El silenciamiento de NSP1 mediante RNA de interferencia, o la inhibición del proteasoma con MG132 causaron un incremento en el nivel de IFITM 2/3 durante la infección con RRV. La incapacidad de UK para inducir la degradación de IFITM 2/3 no parece depender de la cantidad de NSP1 sintetizada. En conjunto, estos resultados sugieren que la disminución del nivel de IFITMs durante la infección con RRV es resultado de una degradación mediada por NSP1 y que requiere del proteasoma, revelando un nuevo blanco de la proteína NSP1 y un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica.

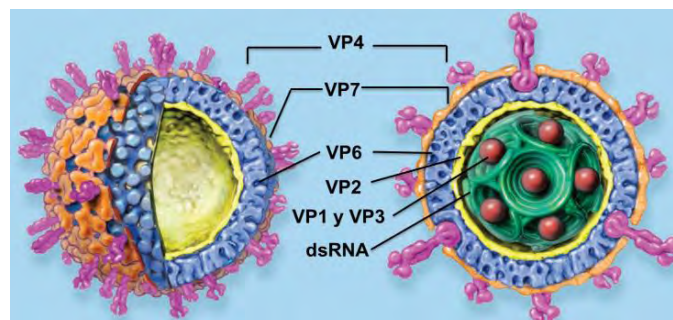


## Introducción

### Rotavirus

Los rotavirus son los principales agentes causales de diarrea severa y deshidratación en infantes y niños pequeños <sup>[49]</sup>. Se estima que en 2008, los rotavirus causaron la muerte de 453 000 niños menores de 5 años en el mundo <sup>[50]</sup>.

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*. Estos virus no presentan envoltura y poseen una cápside icosaédrica compuesta de tres capas de proteínas, las cuales rodean a los 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que conforman el genoma viral (Figura 1) <sup>[36]</sup>. A esta partícula completa también se le conoce como partícula de triple capa (TLP).



**Figura 1. La cápside de los rotavirus consta de 3 capas de proteínas que contienen al genoma viral (representación de una criomicroscopía electrónica).** Capa externa: VP4 y VP7. Capa intermedia: VP6. Capa interna: VP2, VP1 (RNA polimerasa dependiente de RNA) y VP3 (guanilil transferasa, metil transferasa). Adaptada de la referencia [26].

La capa externa de la cápside se compone de la proteína VP7, que conforma la superficie externa del virus, y de VP4 que forma las espículas. VP7 se encuentra glicosilada en la mayoría de las cepas de rotavirus y se agrupa en trímeros <sup>[51]</sup>. Las espículas de VP4 están formadas por trímeros de esta proteína.



La capa intermedia está formada por trímeros de la proteína VP6. Las partículas que no poseen capa externa y por lo tanto, su proteína más expuesta es VP6 se conocen como partículas de doble capa (DLPs) <sup>[36]</sup>.

La capa interna consta de los dímeros de la proteína VP2, de la RNA polimerasa dependiente de RNA (VP1) y de la guanilil-metil-transferasa (VP3) <sup>[15, 36]</sup>.

Los rotavirus también codifican para 6 proteínas no estructurales que son importantes durante la infección: NSP1-NSP6 (Tabla 1) <sup>[36]</sup>.

**Tabla 1. Función de las proteínas no estructurales de rotavirus.** Adaptada de la referencia [36].

Proteína	Función
<b>NSP1</b>	Proteína de unión a RNA y posible ubiquitín ligasa antagonista de IFN.
<b>NSP2</b>	Se une a RNA de cadena sencilla (ssRNA), tiene actividad de NTPasa, nucleósido difosfato cinasa, RNA trifosfatasa y helicasa.
<b>NSP3</b>	Realiza el reconocimiento específico de los mRNAs de rotavirus y previene la unión de los mRNAs celulares a PABP, evitando su traducción.
<b>NSP4</b>	Actúa como receptor para la DLP en el retículo endoplásmico. Tiene actividad de viroporina y enterotoxina.
<b>NSP5</b>	Es probable que regule la unión del RNA a NSP2 durante la replicación y empaquetamiento.
<b>NSP6</b>	Presente en algunas cepas de rotavirus. Se asocia a NSP5. Se desconoce su función.

Adaptada de la referencia [36].

Los genes de rotavirus son monocistronicos, excepto el segmento 11, que codifica para las proteínas NSP5 y NSP6 <sup>[15]</sup>.

## Ciclo replicativo de rotavirus

Los rotavirus infectan enterocitos maduros del intestino delgado, principalmente <sup>[15]</sup>. El proceso de entrada de los rotavirus a su célula blanco, requiere de la interacción de las proteínas VP4 y VP7 del virión con sus receptores en la célula hospedera <sup>[2]</sup>. Para que la infección de rotavirus sea eficiente se requiere el corte proteolítico de VP4, lo que da lugar a las proteínas VP5 y VP8. El estudio con anticuerpos neutralizantes sugiere que VP8 es importante para la unión del virus y que VP5 lo es para la penetración de la membrana de su célula hospedera <sup>[63]</sup>.



La primera interacción de los rotavirus con la célula hospedera implica a la proteína VP8 y a receptores celulares que contienen ácidos siálicos terminales y/o subterminales. Cuando las células se tratan con neuraminidasa para remover los ácidos siálicos terminales, algunas cepas de rotavirus no son capaces de infectar, por lo que a estas cepas se les conoce como “cepas siálico–dependientes”, mientras que aquellas que aún pueden infectar se denominan “cepas siálico–independientes” [15, 36]. Además, los rotavirus interaccionan con otras moléculas celulares (co-receptores) a través de las proteínas VP5 y VP7 [15]. Entre estos co-receptores se encuentran varias integrinas, y la proteína de choque térmico hsc70 [2, 15].

Se sabe que para la entrada de los rotavirus a la célula participan diferentes vías endocíticas dependiendo de la cepa viral que se estudie. Dichas vías parecen estar determinadas por la proteína VP4 que presentan los rotavirus en la capa externa [18]. Entre los mecanismos de entrada estudiados, se encuentran los de las cepas UK (rotavirus bovino) y RRV (rotavirus de simio). El rotavirus UK ingresa mediante endocitosis dependiente de clatrina. Las vesículas de clatrina transportan las partículas de UK hacia los endosomas tempranos, los cuales maduran y finalmente los rotavirus alcanzan los endosomas tardíos de donde se liberan al citoplasma celular. En contraste, el rotavirus RRV ingresa por una vía poco definida, independiente de clatrina y caveolina pero que requiere dinamina. Las partículas de RRV también se transportan hacia endosomas tempranos que pasan por un proceso de maduración; sin embargo, RRV no alcanza los endosomas tardíos, sino que se libera al citoplasma a partir de los endosomas tempranos en maduración (Figura 2) [19, 30].

Se piensa que las bajas concentraciones de calcio provocan la pérdida de la capa externa del virus y su salida a citoplasma. Cuando las partículas se liberan al citoplasma salen como DLPs, las cuales son transcripcionalmente activas. Inmediatamente, la RNA polimerasa viral, VP1 comienza la síntesis de RNA de cadena sencilla positiva ((+)ssRNA) no poliadenilado, a partir del RNA genómico



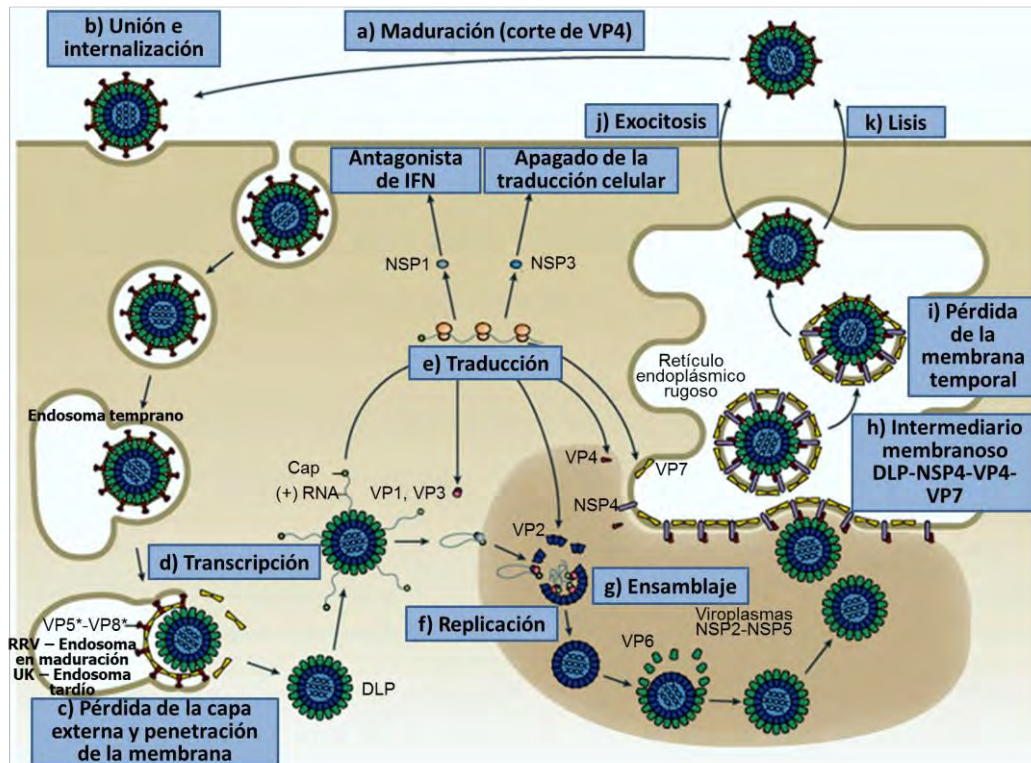


de cadena negativa. VP3 se encarga de colocar el cap a los (+)ssRNAs antes de que salgan de la DLP. Las moléculas de RNA de cadena positiva pueden ser utilizadas para la síntesis de proteínas o, más tarde, como moldes para la síntesis de RNA de cadena negativa durante la replicación (Figura 2) <sup>[15, 63]</sup>.

La replicación de rotavirus ocurre en las estructuras denominadas viroplasmatas, que están formadas por las proteínas NSP2, NSP5, VP1, VP2, VP3 y VP6. En los viroplasmatas se empaquetan los complejos de VP1/VP3 con los ssRNAs virales en los cores formados por VP2 y es en esas partículas (llamadas intermediarios de replicación) donde ocurre la replicación del genoma viral (Figura 2). Es probable que VP2 controle la actividad de VP1 y, a su vez, coordine temporalmente el empaquetamiento del RNA, la replicación del genoma y el ensamble del core <sup>[63]</sup>.

Después de la formación de la capa interna se ensambla VP6 para formar a las DLPs, las cuales se dirigen hacia la cara citosólica del retículo endoplásmico. En el retículo NSP4 media el ensamblaje de VP4 en las DLPs. Además, NSP4 funciona como receptor al interactuar con la VP6 de las DLPs y permitir su gemación hacia el lumen del retículo endoplásmico. En este organelo, se incorpora VP7 y la partícula adquiere una membrana lipídica temporal. La formación completa de la partícula implica la pérdida de la membrana y de NSP4 (Figura 2) <sup>[15, 63]</sup>.

El mecanismo de liberación de los rotavirus es de las etapas menos conocidas. Se sabe que en células no polarizadas las partículas se liberan por lisis, mientras que en células epiteliales intestinales salen por tráfico y secreción a partir del lado apical de la célula (Figura 2) <sup>[35]</sup>.



**Figura 2. Ciclo replicativo de los rotavirus.** a) Para que rotavirus infecte la célula se requiere el corte proteolítico de VP4. b) Una vez que se forma el virión maduro, éste se une a la célula blanco a través de varios receptores, los cuales desencadenan la entrada de rotavirus por una vía endocítica cepa-dependiente. c) Los rotavirus pierden la capa externa en los compartimentos endocíticos correspondientes y se liberan al citoplasma celular. d) Una vez que la partícula de doble capa se encuentra en citoplasma, VP1 y VP3 comienzan la producción de los RNAs de cadena sencilla positiva ((+)ssRNAs) con cap, los cuales sirven para (e) la síntesis de proteínas y como moldes para la síntesis de la hebra negativa del RNA. f) La replicación del genoma de rotavirus ocurre en los viroplasmos formados por NSP2 y NSP5, una vez que VP2 rodea a los 11 segmentos de (+)ssRNA. g) Posteriormente, la partícula adquiere su capa intermedia formada por VP6, formando lo que se conoce como DLP. h) NSP4, posiblemente facilita la formación de un complejo NSP4-VP4-DLP en la cara externa del retículo endoplásmico rugoso. Dicho complejo adquiere una membrana temporal al entrar al retículo. i) Dentro de este organelo se pierde la membrana, NSP4 se disocia del complejo y se ensambla VP7, formando la partícula de triple capa (TLP). j) y k) Se ha propuesto que las TLPs pueden salir de la célula por exocitosis o lisis. Adaptada de la referencia [39, 63].

## Respuesta inmune innata a la infección por rotavirus

El sistema inmunológico es la principal herramienta que posee el organismo para defenderse de las infecciones por patógenos. Uno de los principales mecanismos antivirales con que cuenta el sistema inmunológico son los interferones (IFNs), los cuales son una familia de 3 citocinas relacionadas: el IFN tipo I, conformado por los IFNs  $\alpha$  y  $\beta$ ; el IFN tipo II, conformado por el IFN  $\gamma$ ; y el IFN tipo III, conformado por los IFNs  $\lambda$ . De estos 3 tipos de IFN, los que han demostrado tener mayor



actividad antiviral son el IFN tipo I y el IFN tipo III<sup>[31]</sup>. Este trabajo se centra el IFN tipo I.

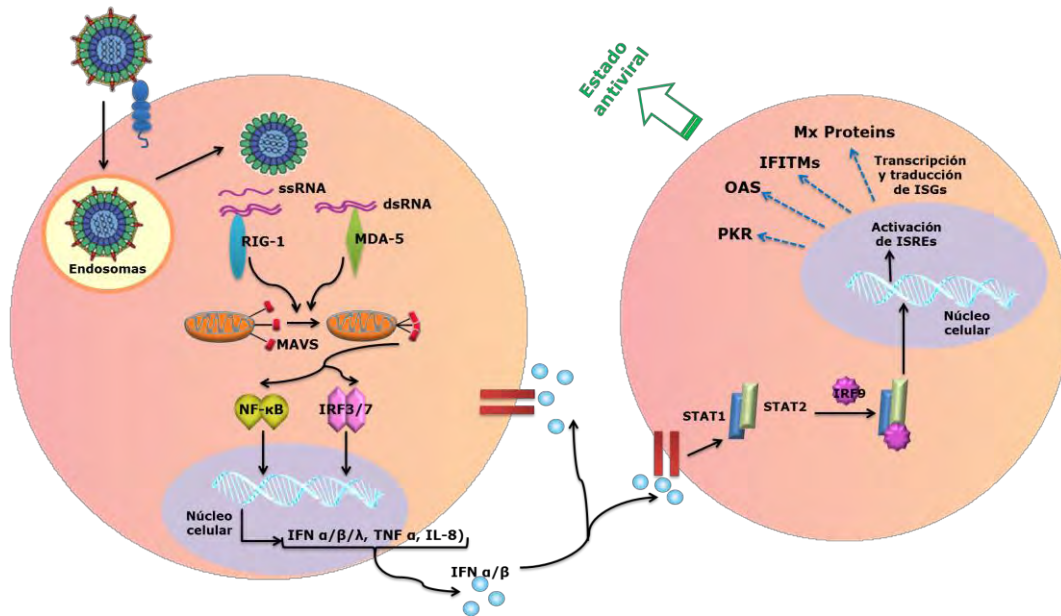
### ***Respuesta mediada por el Interferón de tipo I***

Durante las infecciones virales, el principal componente reconocido por la célula hospedera son los ácidos nucleicos. En el caso de los rotavirus, su RNA puede ser detectado por distintas proteínas celulares, dependiendo de su forma, localización celular y modificación química<sup>[32]</sup>. Los principales sensores del RNA de los rotavirus son la proteína codificada por el gen inducible por ácido retinoico (RIG-1) y la proteína asociada a la diferenciación del melanoma (MDA-5), aunque también se ha sugerido que el receptor tipo Toll 3 (TLR3) podría reconocer el dsRNA de los rotavirus<sup>[71]</sup>. RIG-1 detecta dsRNA con un tamaño que va de 21 bases hasta 1 kilobase, así como ssRNAs no capeados con grupos 5'-trifosfatos expuestos. MDA-5 detecta los RNAs con su 5'-cap no metilado o dsRNA de más de 1 kilobase<sup>[24, 32, 42]</sup>. Aunque no está comprobado que haya dsRNA en citoplasma durante la infección con rotavirus, el dsRNA que active a RIG-1 y MDA-5 podría ser ssRNA con estructuras secundarias<sup>[32]</sup>. Una vez que detectan el RNA, RIG-1 y/o MDA-5 provocan la oligomerización de la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) y posteriormente activan a los factores de respuesta a interferón 3 o 7 (IRF3/7) y al factor nuclear kB (NF-kB). Dichos factores de transcripción se translocan al núcleo celular, desencadenando la producción de IFN  $\alpha$  o  $\beta$  (IFN tipo I) (Figura 3)<sup>[24, 32]</sup>.

El IFN tipo I puede estimular tanto a la célula infectada como a las células vecinas no infectadas, induciendo un estado de resistencia a la replicación viral en ellas<sup>[46]</sup>. La unión de IFN tipo I a su receptor (IFNAR) en la célula blanco desencadena la señalización a través de las cinasas Janus (JAK) y los transductores de señales y activadores de la transcripción (STATs). La oligomerización del IFNAR y una serie de fosforilaciones provocan la formación de un dímero STAT1-STAT2 estable. El dímero STAT1-STAT2 se asocia con IRF9 para formar un trímero que se transloca al núcleo y que se une a los elementos de respuesta estimulados por



IFN (ISRE), presentes en los promotores de la mayoría de los genes estimulados por IFN (ISG), incrementando su transcripción. Entre los genes inducibles por IFN tipo I se encuentran: las proteínas transmembranales inducibles por interferón (IFITMs), la proteína cinasa R (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintasa (OAS) y las proteínas Mx (Figura 3) [55].



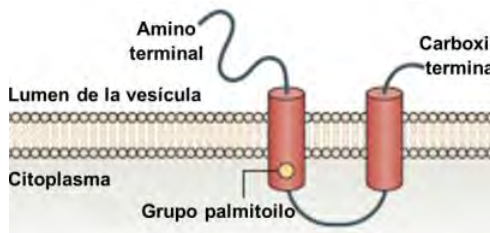
**Figura 3. Reconocimiento de los rotavirus y respuesta inmune innata mediada por IFN tipo I.** Los rotavirus entran a la célula a través de endosomas. Cuando la partícula de doble capa (DLP) se libera a citoplasma, la proteína codificada por el gen inducible por ácido retinoico (RIG-1) y la proteína asociada a la diferenciación del melanoma (MDA-5) pueden detectar el RNA de doble cadena de la partícula viral. La activación de cualquiera de estos dos sensores provoca la oligomerización de la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS), lo que culmina en la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B e IRF3 o IRF7. NF- $\kappa$ B o los IRFs activados se translocan al núcleo celular, donde inducen la transcripción de genes que codifican para varias citocinas proinflamatorias, entre ellas, el IFN tipo I (principalmente  $\alpha$  y  $\beta$ ). El IFN tipo I puede actuar de manera autócrina o parácrina. Una vez unido a su receptor, el IFN tipo I activa a través del complejo STAT1-STAT2 e IRF9. Este complejo trimérico se transloca al núcleo y provoca la expresión de genes con elementos de respuesta estimulados por IFN (ISREs) en su promotor, lo que conlleva a la producción de una gran cantidad de proteínas que en conjunto establecen un estado antiviral [28, 39].

### **Proteínas transmembranales inducibles por interferón (IFITMs)**

Las IFITMs son proteínas que se inducen por los IFNs tipo I y tipo II<sup>[16]</sup>. Hasta el momento, se conocen 5 miembros de la familia de las IFITMs en humanos: IFITM 1, IFITM 2, IFITM 3, IFITM 5 y IFITM 10<sup>[60]</sup>; sin embargo, solamente se ha demostrado que IFITM 1, IFITM 2 y IFITM 3 tienen acción antiviral<sup>[6]</sup>.



Las IFITMs se encuentran principalmente en la membrana plasmática y en las membranas endosomales, aunque también se ha sugerido que puede localizarse en otros organelos<sup>[11, 52]</sup>. La IFITM 1 se encuentra en la membrana plasmática y endosomas tempranos, mientras que las IFITM 2 y IFITM 3 se localizan principalmente en endosomas tardíos, lisosomas y autolisosomas<sup>[52, 60]</sup>. Estas proteínas poseen un dominio citoplasmático y dos dominios transmembranales. Uno de los dominios transmembranales se encuentra palmitoilado. La localización de sus extremos amino y carboxilo terminal aún se encuentra en debate; algunos grupos sugieren que se encuentran en el lumen de los endosomas (Figura 4), mientras que otros proponen que están en el citoplasma celular<sup>[16]</sup>.



**Figura 4. Estructura de las IFITMs.** Las IFITMs poseen dos dominios transmembranales, el primero de ellos con un grupo palmitoilo. Estos dominios se conectan a través de un dominio citoplasmático. La localización de sus extremos amino y carboxilo terminal no se encuentra definida Adaptada de la referencia [16, 26].

Aunque las IFITMs se conocen desde hace más de 30 años, la evidencia que desencadenó su estudio como factores de restricción viral, ocurrió en 2009, cuando Brass y colaboradores observaron que estas proteínas conferían resistencia a la replicación de los virus de la influenza A, del dengue y del oeste del Nilo<sup>[11]</sup>. A partir de entonces se comenzó a describir que las IFITMs son capaces de bloquear la infección de varios virus, entre ellos los virus de la hepatitis C (HCV), el de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, ébola, el de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) y el del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)<sup>[52, 60]</sup>. Todos los anteriores son virus envueltos, por lo que parecía que las IFITMs sólo afectaban la infectividad de los virus que presentaban envoltura lipídica. Sin embargo, en el 2013 Anafú *et al* encontraron que las IFITMs también restringían la entrada de reovirus, un miembro de la familia *Reoviridae*<sup>[1]</sup>. Este hallazgo abrió la posibilidad de una respuesta antiviral mediada por IFITMs también en virus sin envoltura.



En el caso del virus de la influenza, se ha visto que el tratamiento con IFN tipo I disminuye la infectividad a menos del 10%, pero si se interfiere con la expresión de IFITM 3 en estas mismas condiciones, la infectividad se recupera casi completamente. Lo que sugiere que IFITM 3 es responsable de una gran parte de la respuesta antiviral inducida por IFN tipo I durante la infección del virus de la influenza<sup>[11]</sup>.

El modo de acción de las IFITMs es poco claro y se han propuesto varios mecanismos que podrían mediar su acción antiviral, entre ellos: <sup>[22]</sup>

- Impedimento de la localización correcta de las moléculas de clatrina en las vesículas endocíticas <sup>[65]</sup>.
- Incremento de la densidad lipídica en las membranas celulares, haciéndolas menos fluidas y, por lo tanto, menos aptas para la fusión membranal <sup>[1]</sup>.
- Interferencia con la acidificación endosomal y la activación de las proteasas, factores necesarios para la liberación del virus al citoplasma <sup>[38, 65]</sup>.

Hasta ahora, sólo se conoce un virus capaz de interferir con la acción de las IFITMs: el virus de la hepatitis C (HCV). HCV produce un microRNA (miR-130a) capaz de impedir la expresión de IFITM 1 y así, permitir el establecimiento de una infección persistente <sup>[10]</sup>. Sin embargo, el hecho de que existen varios virus cuya infectividad no disminuye por las IFITMs<sup>[68, 70]</sup>, sugiere que estos virus podrían tener mecanismos para contrarrestar la actividad de estas proteínas.

## **Defensa de rotavirus contra la inmunidad innata**

Los rotavirus poseen estrategias que les permiten contrarrestar la respuesta inmunológica innata de la célula. La proteína VP3 realiza dos funciones que contrarrestan la respuesta inmunológica. La primera función es poner el cap en el extremo 5´ de los RNAs mensajeros virales para evitar su reconocimiento por RIG-



1 y MDA-5. La segunda actividad es la de 2'5'-fosfodiesterasa (PDE). Ante la presencia de dsRNA en el citoplasma celular, la 2'5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) celular forma 2'5' oligoadenilatos, los cuales se encargan de activar a la Ribonucleasa L (RNasa L). RNasa L degrada los RNAs tanto virales como celulares. La actividad de PDE de la VP3 de rotavirus escinde los 2'5' oligoadenilatos y así impide la activación de la RNasa L. Además, rotavirus cuenta con una proteína especialista en combatir la respuesta mediada por el IFN tipo I: la proteína no estructural NSP1 <sup>[45]</sup>.

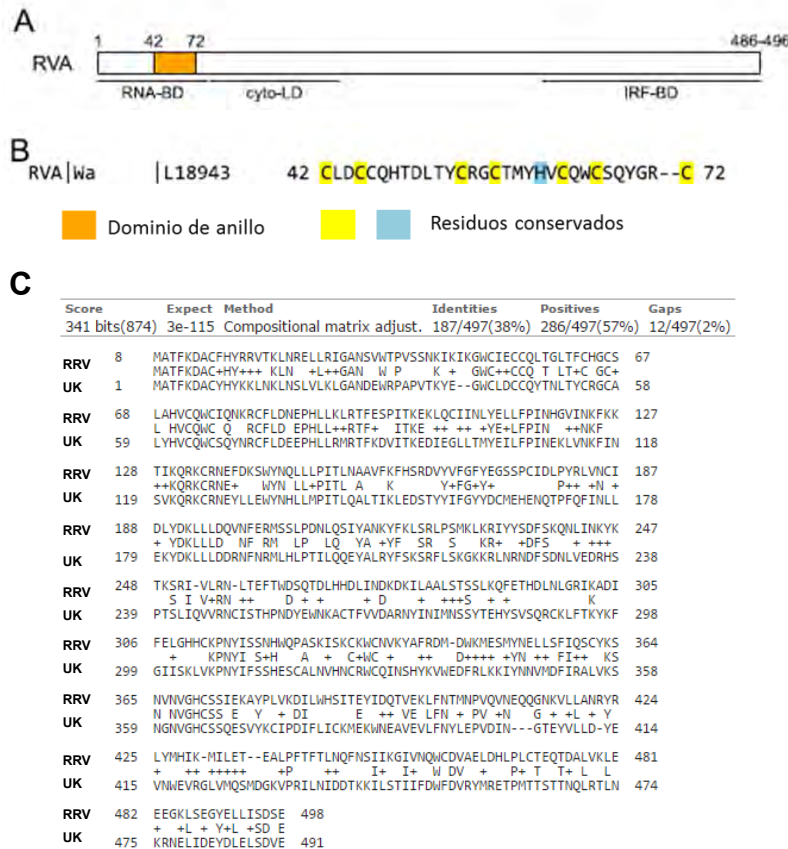
### ***NSP1 como antagonista de IFN tipo I***

NSP1 es la proteína menos conservada entre las diferentes cepas de rotavirus (Figura 5). Inicialmente, el papel de NSP1 en el ciclo replicativo del virus no fue claro, ya que se observó que esta proteína era prescindible para la replicación de rotavirus; sin embargo, se vio que las cepas que tenían mutaciones en su NSP1 formaban placas más pequeñas <sup>[61]</sup>. Además, en un ensayo de dos híbridos, Graff *et al* encontraron que esta proteína viral interactuaba directamente con la proteína IRF3, proponiendo que NSP1 podía tener un papel importante en el control de la respuesta inmune innata <sup>[29]</sup>. Por otro lado, el análisis filogenético de las diferentes secuencias genómicas de NSP1 indica que este gen segrega en diferentes grupos de acuerdo al hospedero, sugiriendo que NSP1 es importante para determinar el rango de hospederos susceptibles de una cepa <sup>[20, 23, 45]</sup>. Todos los hallazgos anteriores cobraron sentido cuando se descubrió que NSP1 media la degradación de varias proteínas de respuesta inmune innata y este fenómeno depende de la cepa viral y del hospedero celular (Tabla 2) <sup>[57]</sup>.

La mayoría de los blancos conocidos de la proteína NSP1 participan en la producción de IFN tipo I. Uno de los mecanismos más comunes a las diferentes cepas es la degradación de los IRFs <sup>[3]</sup>; sin embargo, durante la infección con la cepa OSU no hay producción de IFN  $\beta$ , a pesar de que IRF3 se acumula en el núcleo. Este hecho llevó a encontrar un nuevo mecanismo por el cual se interfiere con la producción del IFN tipo I pero a través de la vía de NF- $\kappa$ B: la degradación



de  $\beta$ -TrCP<sup>[34]</sup>. Además de los IRFs y de  $\beta$ -TrCP, se sabe que RIG-1 y MAVS también pueden ser degradados a través de la NSP1 de los rotavirus (Tabla 2)<sup>[37, 54]</sup>.



**Figura 5. La NSP1 de los rotavirus es la proteína más variable y su estructura sugiere una función de ubiquitín ligasa E3. a)** NSP1 es una proteína poco conservada entre las distintas cepas y grupos de rotavirus; sin embargo, posee un dominio conservado N-terminal de tipo anillo. **b)** Dominios de anillo de representativo del grupo A de los rotavirus. Se muestran los residuos conservados: cisteínas en amarillo e histidinas en azul. **c)** Alineamiento (National Center for Biotechnology Information, protein blast) de la secuencia de las proteínas NSP1 de RRV y UK. Destaca el bajo porcentaje de identidad entre ellas (38%) Adaptada de la referencia [45].

Se ha encontrado que NSP1 interacciona con varias proteínas celulares a través de su extremo carboxilo terminal. El mecanismo por el cual media la degradación de dichas proteínas aún no es completamente claro y depende de la proteína celular que se trate, pero, en general, esta degradación es mediada por el proteasoma<sup>[3, 8]</sup>. Lo anterior junto con el hecho de que esta proteína viral posee un





dominio conservado N-terminal tipo anillo (RING-domain), sugiere que podría tener una actividad de ubiquitín ligasa E3 <sup>[45]</sup>.

Por otra parte, se sabe que NSP1 puede impedir la activación de STAT1 y la translocación de STAT1 y STAT2 al núcleo <sup>[33, 59]</sup>.

**Tabla 2. Blancos de degradación de NSP1 de algunas cepas de rotavirus.**

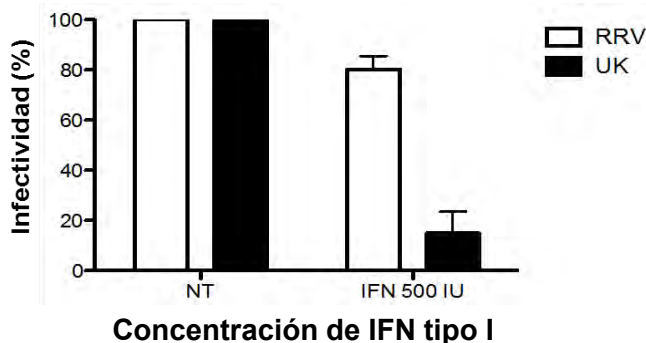
Cepa	Proteína(s) blanco	Línea celular	Mecanismo
<b>RRV</b>	IRF3	293T <sup>[3]</sup> , COS-7 <sup>[57]</sup>	Dependiente de proteasoma <sup>[3]</sup>
	IRF5	293T <sup>[3]</sup>	
	IRF7	293T <sup>[3]</sup>	
	MAVS	HT 29 <sup>[47]</sup>	
<b>UK</b>	IRF3	293T <sup>[3]</sup> , COS-7 <sup>[57]</sup>	Dependiente de proteasoma <sup>[3]</sup>
	IRF7	293T <sup>[3]</sup>	
<b>Wa</b>	IRF7	293T <sup>[3]</sup>	
	MAVS	HT 29 <sup>[47]</sup>	
<b>SA11</b>	IRF7	293T <sup>[3]</sup>	Dependiente de proteasoma <sup>[8]</sup>
	IRF5	293T <sup>[3]</sup>	
	MAVS	HT 29 <sup>[47]</sup>	
<b>DS-1</b>	IRF7	293T <sup>[3]</sup>	
	IRF5	293T <sup>[3]</sup>	
	MAVS	HT 29 <sup>[47]</sup>	
<b>OSU</b>	β-TrCP	293T <sup>[3]</sup>	Mimetiza la estructura de los fosfodegrones que reconoce β-TrCP <sup>[44]</sup>
	MAVS	HT 29 <sup>[47]</sup>	Dependiente de proteasoma y ubiquitinación <sup>[47]</sup>
	RIG-1	293FT <sup>[54]</sup>	Independiente de proteasoma <sup>[54]</sup>

IRF = Factor de respuesta a IFN, MAVS = Proteína de señalización antiviral mitocondrial, RIG-1 = Gen inducible por ácido retinoico 1 (sensor de dsRNA), β-TrCP = Proteína que contiene repetidos de transducina beta.



## Antecedentes

En nuestro grupo de trabajo se estudió la susceptibilidad de dos cepas de rotavirus, RRV y UK, al tratamiento de células MA104 con IFN tipo I. Los resultados mostraron que la infectividad de la cepa de simio RRV no se modificó significativamente bajo ninguna de las concentraciones del IFN tipo I probadas. En cambio, la cepa bovina UK sí fue susceptible al tratamiento con IFN tipo I, disminuyendo su infectividad hasta en un 80% (Figura 6) <sup>[12]</sup>. Este hallazgo es relevante porque sugirió que RRV posee un mecanismo de evasión de la respuesta inmune celular que la cepa UK no tiene y que podría representar un buen sistema para estudiar la respuesta viral al tratamiento con IFN tipo I.



**Figura 6. El IFN tipo I disminuye la infectividad de la cepa UK pero no la de la cepa RRV.** Las células MA104 se trataron con 500 Unidades Internacionales (UI) del IFN tipo I por 16 h y se infectaron con RRV y UK. La infectividad se evaluó mediante el ensayo de formación de focos. Los datos se normalizaron tomando como 100% las células no tratadas con IFN tipo I (NT). Las barras indican la desviación estándar de dos experimentos independientes (n=2) por triplicado. Adatada de la referencia [12]

Cuando se encuentra que dos cepas virales presentan un fenotipo distinto, como el que se observó con RRV y UK respecto a la susceptibilidad al IFN tipo I, una pregunta importante es determinar cuál de los genes virales es responsable de dicho fenotipo. Para esto se realizan ensayos con virus rearreglantes obtenidos a partir de las cepas parentales. Las rearreglantes son virus que se generan al coinfectar células con dos cepas virales distintas (cepas parentales); por lo tanto, la progenie (rearreglantes) contiene diferentes combinaciones de los genes de las cepas parentales. La caracterización del fenotipo de resistencia al IFN tipo I de las rearreglantes entre las cepas RRV y UK mostró que los viriones que presentan el gen *VP4* de RRV son resistentes al IFN tipo I, mientras que los que tienen el gen



VP4 de UK son susceptibles. Lo anterior sugiere que la proteína VP4 está relacionada con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad al IFN tipo I <sup>[12]</sup>. Sin embargo, no se contó con una rearreglante que tuviera el gen *VP4* de una de las cepas en el fondo genético de la otra y que permitiera confirmar lo anterior.

Como se mencionó anteriormente, VP4 determina la vía de entrada del virus a la célula: mientras que el tráfico endosomal de UK termina hasta los endosomas tardíos, RRV solamente alcanza los endosomas tempranos en maduración y de ahí se libera al citoplasma<sup>[18, 19, 30]</sup>. ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~ Por lo anterior, podría ser que la diferencia en la susceptibilidad al IFN tipo I esté relacionada con el mecanismo de entrada de cada cepa, lo cual, junto con el hecho de que las IFITMs se encuentran en diferentes compartimentos endosomales, llevó a pensar que alguna de estas proteínas podrían mediar la susceptibilidad de UK al IFN tipo I. Además, en algunos lentivirus ya se ha observado una susceptibilidad a las IFITMs dependiente de la cepa<sup>[53]</sup>.



## Hipótesis

Si la acción de las IFITMs durante la entrada viral es responsable de la diferente susceptibilidad de las cepas RRV y UK de rotavirus al IFN tipo I, entonces la modulación del nivel de estas proteínas provocará cambios en la infectividad de UK pero no en la de RRV.



## Objetivo general

Determinar la participación de las IFITMs en el fenotipo de resistencia o susceptibilidad al IFN tipo I que tienen las cepas de rotavirus RRV y UK.

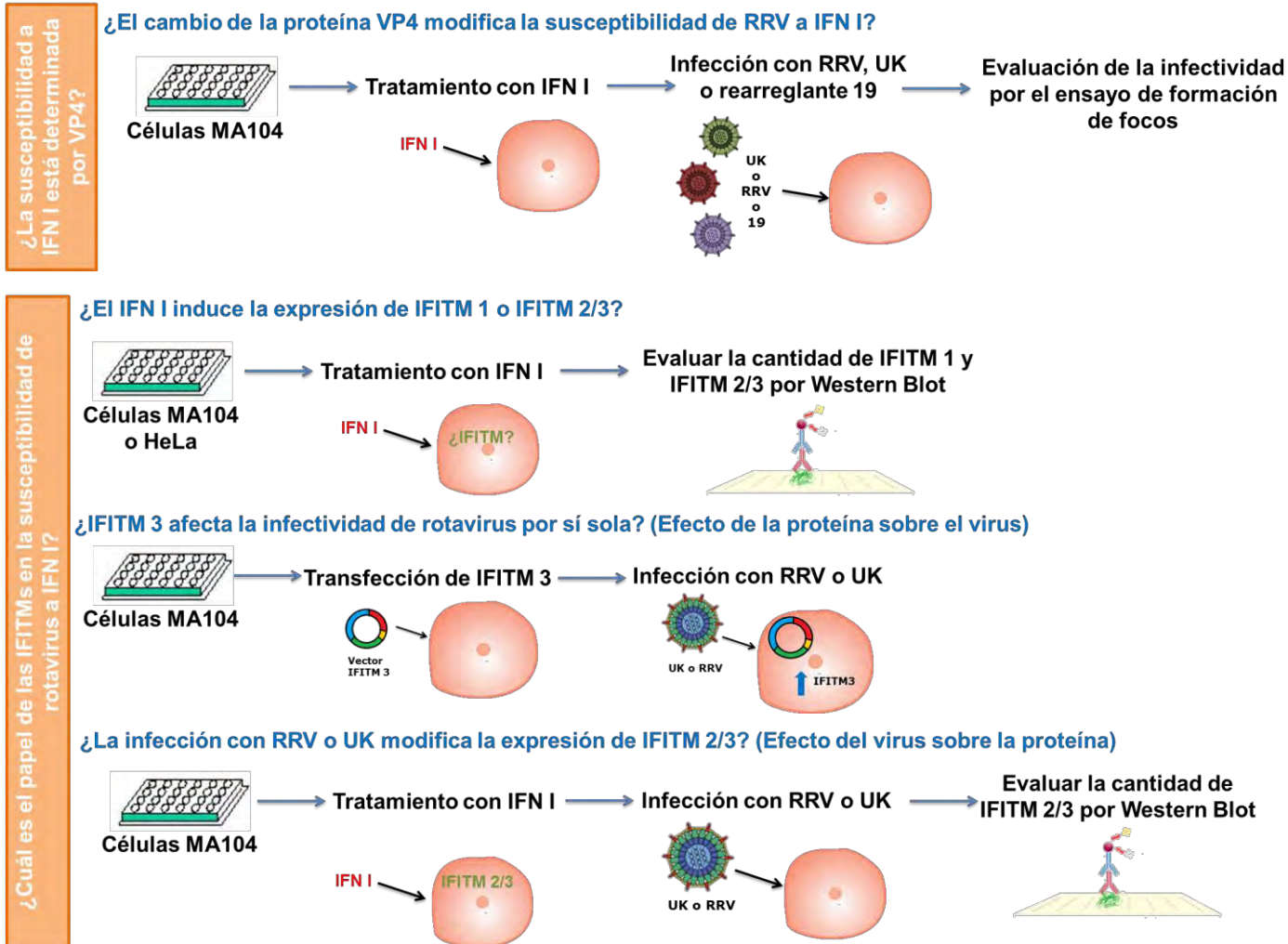
## Objetivos particulares

- Determinar si el tratamiento con IFN tipo I induce la expresión de las IFITMs en las células MA104.
- Determinar si las IFITMs son responsables de la susceptibilidad al IFN tipo I de la cepa de rotavirus UK.
- Estudiar si la resistencia o susceptibilidad a las IFITMs está relacionada con algún gen viral.



## Materiales y métodos

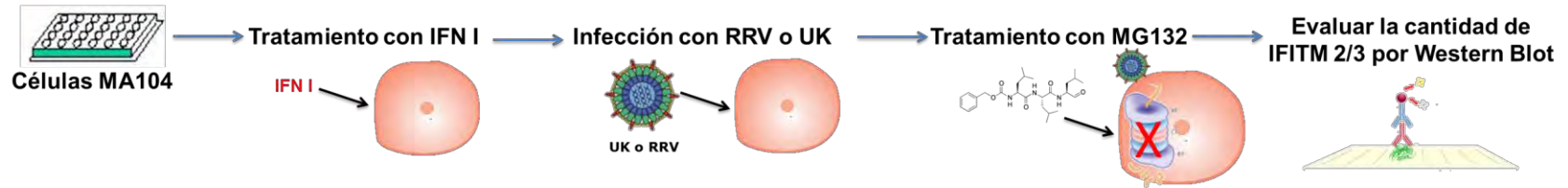
### Esquema general de trabajo



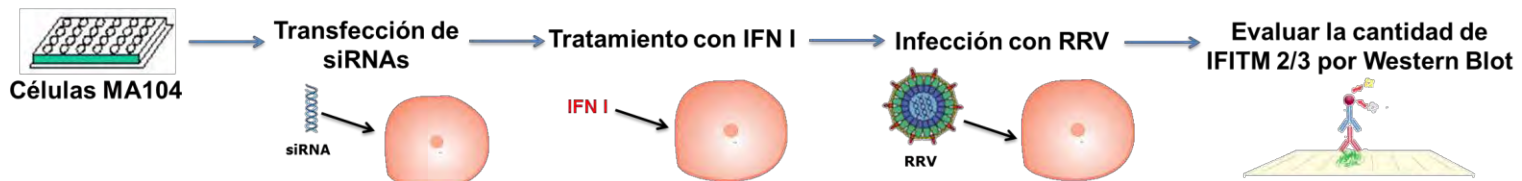


¿A qué se debe la disminución de IFITM 2/3?

¿El proteasoma es necesario para la disminución de IFITM 2/3?



¿El silenciamiento de NSP1 evita que RRV disminuya la cantidad de IFITM 2/3?

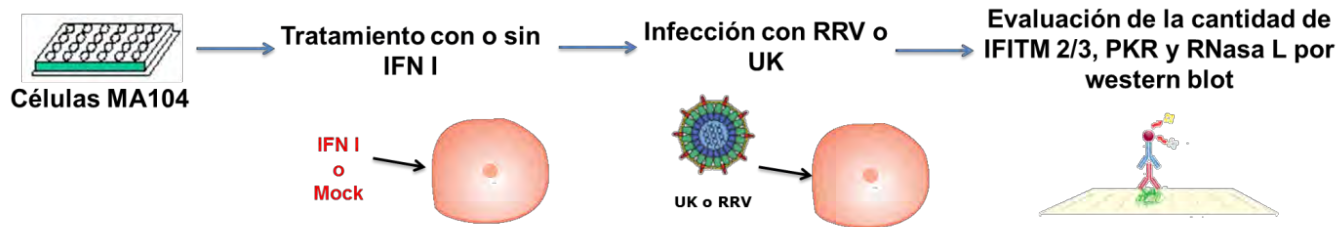


¿La capacidad de disminuir la cantidad de IFITM 2/3 correlaciona con algún gen viral?



¿La disminución de IFITM 2/3 es un fenómeno general de los ISGs?

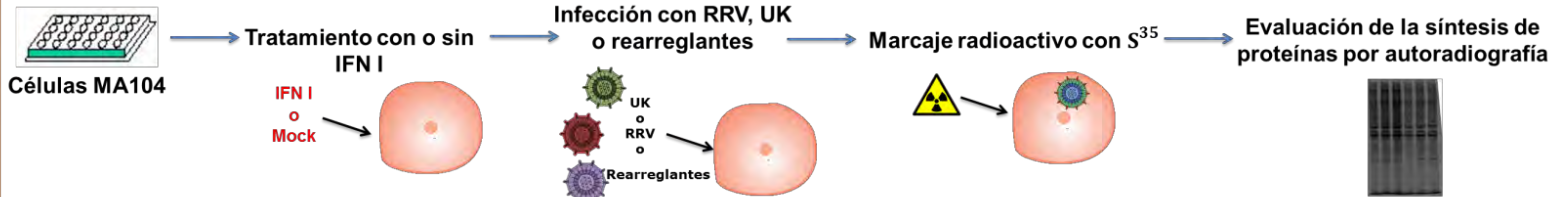
¿RRV o UK modifican la cantidad de PKR y/o RNasa L?





¿UK no puede degradar IFITM debido a que el IFN I provoca una menor síntesis de NSP1?

¿El tratamiento con IFN I afecta la síntesis de proteínas de las distintas cepas y rearrreglantes de rotavirus?







## Líneas celulares y cepas virales

Las líneas celulares MA104 de riñón de mono verde y HeLa de adenocarcinoma de cérvix fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Scientific, Pittsburg, USA) con 5% de suero fetal bovino (SFB) y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las cepas virales empleadas RRV (rotavirus de simio), UK (rotavirus bovino) y las rearreglantes fueron donadas por H.B. Greenberg (Stanford University) y Y. Hoshino (NIAID, NIH, Bethesda, MD), respectivamente.

## Anticuerpos, reactivos y plásmidos

El IFN tipo I utilizado fue el interferón recombinante IFN  $\alpha$ /D (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron:  $\alpha$ -IFITM 1 (Proteintech, Chicago, IL),  $\alpha$ -IFITM 2/3 (Proteintech, Chicago, IL),  $\alpha$ -HA-probe (F-7) (Santa Cruz Biotechnology, CA)  $\alpha$ -RNasa L (Abcam, Cambridge, MA) y  $\alpha$ -PKR B-10 (Santa Cruz Biotechnology, CA). Se utilizó el suero policlonal dirigido a NSP2 ( $\alpha$ -NSP2), el suero dirigido a partículas purificadas de rotavirus ( $\alpha$ -TLPs) (ambos obtenidos en nuestro laboratorio) y los anticuerpos policlonales purificados dirigidos a la NSP1 de RRV ( $\alpha$ -NSP1 RRV) o a la NSP1 de UK ( $\alpha$ -NSP1 UK) (GeneScript (Hong Kong)). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: conejo  $\alpha$ -ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Invitrogen, Eugen, Oregon), cabra  $\alpha$ -conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo scientific, IL),  $\alpha$ -ratón conjugado con Alexa 488 (Invitrogen, Eugen, Oregon) y cabra  $\alpha$ -conejo conjugado con Alexa 568 (Life technologies, CA). Se utilizó el sustrato quimioluminiscente Western lightning Plus system (Perkin Elmer, Massachusetts). El plásmido pQXCIP con la región codificante para IFITM 3 fusionada a un tag de hemaglutinina fue donado por A. Brass (Harvard Medical School). Se utilizaron los RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) para NSP1 cuya secuencia blanco es: AAU UGG AGC AAA UUC AGU AUG (Dharmacon Research, Lafayette, CO) <sup>[43]</sup>; como control irrelevante se usó el Non-Targeting siRNA #3 (Dharmacon Research, Lafayette, CO). Para transfectar se utilizaron lipofectamina Ltx y oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usó el fármaco MG132 (carbобензохи-Leu-Leu



Leucinal) (Calbiochem, La Jolla, CA). Para los ensayos de marcaje radioactivo se utilizó  $S^{35}$  (Easy-tag express-[ $^{35}S$ ] labeling mix) (Dupont, Boston).

### **Incubación de células con IFN tipo I**

Las células MA104 se trataron con IFN tipo I (500 UI/mL) durante 12, 18 o 24 h para los ensayos de cinética de inducción de IFITM con IFN tipo I; o durante 18 horas para el resto de los ensayos.

### **Infección**

Los lisados con las cepas virales correspondientes se activaron con tripsina (10  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 30 minutos a 37 °C.

Las células se lavaron con Minimum Essential Medium (MEM) libre de SFB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se agregaron los lisados de las cepas correspondientes previamente activados y se adsorbió durante 1 hora a 37 °C. Después se realizaron 2 lavados, se añadió MEM y se continuó incubando a 37 °C el tiempo correspondiente a cada ensayo.

### **Evaluación de la infectividad mediante el ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa**

Las células se infectaron con las cepas correspondientes a una multiplicidad de infección (MOI) de  $0,02 \frac{UFF}{cel}$ . A las 14,5 horas post-infección (h.p.i.) se retiró el medio a las células y se fijaron con acetona al 80% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó el anticuerpo  $\alpha$ -TLPs a una concentración de 1:2000 durante 1 hora a 37 °C. Se realizó 1 lavado con PBS y se colocó proteína A conjugada con peroxidasa a una concentración de 1:3000 durante 1 hora a 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó 1 lavado con PBS y se agregó el sustrato carbazol. El número de focos se contó utilizando un aumento de 20X.



## Transfección de plásmidos

Las células MA104 se transfectaron con los vectores que codifican IFITM 3 fusionados a epítopes de hemaglutinina (HA) mediante lipofección, utilizando el método de transfección tradicional. Para esto, las monocapas de células a 80% de confluencia se lavaron con MEM libre de SFB. Posteriormente se colocó la mezcla de lipofectante con el plásmido correspondiente (500 ng/1,3 X 10<sup>5</sup> células) y se incubó por 4-5 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró la mezcla de transfección y se colocó DMEM con 10% de SFB. Las células se continuaron incubando hasta completar 24 horas desde la transfección y se infectaron con RRV o UK durante 8 horas a una MOI de 10  $\frac{UFF}{cel}$ . La infectividad se determinó mediante inmunofluorescencia, contando el número de células infectadas del total de células transfectadas (100%).

## Ensayos de inmunofluorescencia

Las células MA104 se crecieron en cubreobjetos y terminados los ensayos correspondientes se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos con la solución de lavado (PBS/NH<sub>4</sub>Cl 50 mM). Posteriormente, las células se permeabilizaron usando Tritón X-100 al 0,5 % en solución de bloqueo (PBS/NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, 1% de BSA), durante 20 minutos. En seguida, las monocapas se bloquearon con la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Después, las células se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos  $\alpha$ -HA (1:2000) para teñir IFITM 3 y  $\alpha$ -NSP2 (1:1000) para teñir viroplasma. Transcurrido el tiempo de incubación, las monocapas se lavaron 4 veces durante 5 minutos con la solución de lavado para después colocar los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora: Alexa 488  $\alpha$ -ratón (1:1000) y Alexa 568  $\alpha$ -conejo (1:1000). Al terminar, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con la solución de lavado. Se agregó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos celulares (1:500 000) durante 20 minutos y se realizaron 4 lavados de 10 minutos. Los cubreobjetos con las células se montaron en un portaobjetos y finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio de



epi-fluorescencia Axioscop 2 mot plus acoplado a una cámara Photometrics CoolSNAP HQ2.

### **Transfección de RNAs pequeños de interferencia (siRNAs)**

Las células MA104 se transfectaron con los siRNAs para NSP1 o un control irrelevante mediante lipofección en MEM libre de suero, utilizando el método de transfección reversa. En cada pozo se colocaron los siRNAs correspondientes, a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y en seguida la solución de oligofectamina (15  $\mu\text{L}$  por cada mL); esta mezcla se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó una suspensión celular a una concentración de  $1,5 \times 10^5 \frac{\text{cel}}{\text{mL}}$ . Las células se incubaron a 37 °C por al menos 16 horas, tiempo al cual el medio fue cambiado por DMEM con 5 % de SFB y se continuó incubando hasta completar 48 h de silenciamiento. Finalmente, las células interferidas se infectaron con RRV a una MOI de  $5 \frac{\text{UFF}}{\text{cel}}$ .

### **Evaluación del nivel de IFITM 1, IFITM 2/3, RNasa L o PKR.**

Se evaluó:

- El nivel de IFITM 1 en células MA104 y HeLa sin o con IFN tipo I.
- El nivel de IFITM2/3 en células MA104 sin o con IFN tipo I.  
\*IFITM 2 y IFITM 3 poseen secuencias muy similares, por lo que aunque el anticuerpo utilizado está dirigido contra un péptido de IFITM 3, se ha reportado que también podría reconocer IFITM 2.
- El nivel de RNasa L en células MA104 sin o con IFN tipo I.
- El nivel de PKR en células MA104 sin o con IFN tipo I.

Cuando las células se infectaron con alguna cepa viral se utilizó una MOI de  $5 \frac{\text{UFF}}{\text{cel}}$ .

La detección de las proteínas se realizó mediante ensayos de western blot. Las células se lisaron utilizando buffer de Laemmli y las proteínas se desnaturalizaron



por ebullición durante 5 minutos. Las muestras se corrieron mediante SDS-PAGE y posteriormente se transfirió a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) durante 30 minutos. Las membranas se secaron durante 15 minutos y posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente ( $\alpha$ -IFITM 1 1:1000 toda la noche a 4 °C;  $\alpha$ -IFITM 2/3 1:2500 1 h a temperatura ambiente;  $\alpha$ -RNasa L 1:2500 toda la noche a 4 °C; o  $\alpha$ -PKR 1:1000 toda la noche a 4 °C) diluido en la solución de bloqueo (0,1% de Tween 20, 5% de leche en PBS). Finalizados los tiempos correspondientes, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 0,1% de Tween 20 en PBS. En seguida, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa ( $\alpha$ -ratón 1:1000,  $\alpha$ -conejo 1:2500) diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 1% de Tween 20 en PBS. El anticuerpo unido a la proteína se detectó por quimioluminiscencia utilizando luminol como sustrato de la enzima.

### **Evaluación de la síntesis de proteínas mediante marcaje radioactivo**

Las células MA104 se trataron o no con IFN tipo I y se infectaron o no con las cepas o rearreglantes correspondientes. A las 5 h.p.i. se cambió el medio de cultivo por DMEM sin metionina ni cisteína con 25  $\mu$ Ci/mL de  $S^{35}$  y se continuó incubando durante 1 h más. Las células se cosecharon al completar las 6 h.p.i. y las muestras se evaluaron mediante SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie y autorradiografía.



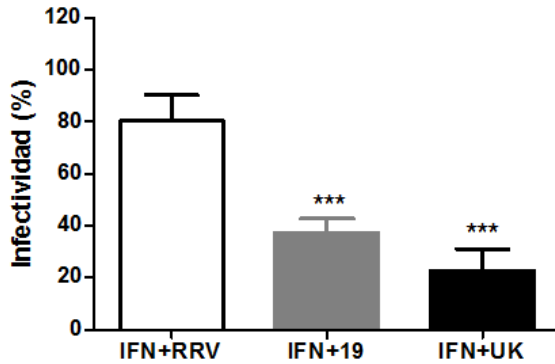
## Resultados

### **La susceptibilidad de rotavirus a IFN tipo I está asociada a la proteína VP4.**

En estudios previos del laboratorio se evaluó la susceptibilidad al tratamiento con IFN tipo I de varias rearreglantes entre las cepas RRV y UK. Estos ensayos sugirieron que la susceptibilidad de las rearreglantes al IFN tipo I depende de que cepa parental provenga su proteína VP4<sup>[12]</sup>. Sin embargo, entre las rearreglantes probadas no había alguna que tuviera la VP4 de uno de los virus en el fondo genético del otro y que permitiera corroborar la hipótesis planteada.

Al iniciar este trabajo, se logró obtener una cepa rearreglante que tiene las proteínas VP4 y NSP2 del rotavirus UK en el fondo genético de la cepa RRV (rearreglante 19). La infectividad de esta rearreglante se evaluó utilizando células MA104 tratadas con IFN tipo I. Esto se realizó mediante el ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa.

Encontramos que el solo cambio de la proteína VP4 en la rearreglante, hizo a RRV susceptible al IFN tipo I, disminuyendo su infectividad a 37% (Figura 7). Este bajo porcentaje de infectividad contrasta con el de la cepa parental RRV (80%) y se acerca al de la cepa donadora del gen 4, UK (23%) (Figura 7). Estos resultados complementan el estudio realizado por J. M. Carreño en el que encontró que las cepas que tienen la proteína VP4 de RRV son resistentes al IFN tipo I, mientras que las que tienen la VP4 de UK son susceptibles. Lo anterior indica que VP4, involucrada en la entrada de rotavirus, define si la cepa viral es o no susceptible al IFN tipo I.

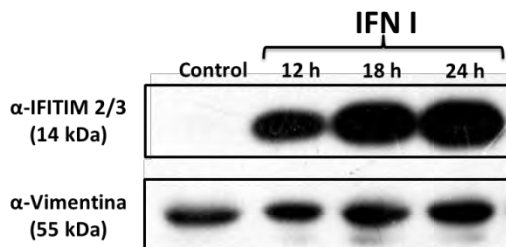


**Figura 7. La susceptibilidad a IFN tipo I está asociada con la proteína VP4.** Las células MA104 se trataron con 500 UI/mL del IFN tipo I por 18 h y se infectaron con RRV, UK o la rearreglante 19 durante 14 h. La infectividad se evaluó mediante el ensayo de formación de focos por inmunoperoxidasa. Los datos se normalizaron tomando como 100% de infectividad las células no tratadas con IFN I e infectadas con las cepas respectivas. Las barras indican el error estándar de la media de cuatro experimentos independientes (n=4) por triplicado. \*\*\* p<0,01 vs células sin IFN I.

### IFITM 2/3 se induce en las células MA104 por el tratamiento con IFN tipo I de manera dependiente del tiempo.

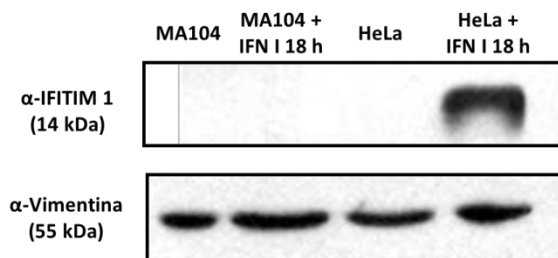
Si las IFITMs juegan un papel en la diferente susceptibilidad de RRV y UK a IFN tipo I, esperaríamos que el tratamiento con IFN tipo I produjera un incremento en el nivel de dichas proteínas. Así que se decidió evaluar el nivel de IFITM 1 y IFITM 2/3 en células MA104 tratadas o no con IFN tipo I a diferentes tiempos, mediante ensayos de western blot.

Encontramos que en las células MA104 no tratadas con IFN tipo I no se detectó la presencia de IFITM 2/3. Sin embargo, al tratarlas con IFN tipo I, se indujo la expresión de esta proteína y se observó que el nivel de IFITM 2/3 incrementó conforme al tiempo de estímulo (Figura 8). Estos resultados también sugieren que IFITM 2/3 podría participar en la disminución de la infectividad de UK provocada por el tratamiento con IFN tipo I, ya que estas proteínas no se encuentran en condiciones basales en las células MA104 pero se inducen en respuesta al estímulo con IFN tipo I.



**Figura 8. El tratamiento con IFN tipo I induce la expresión de IFITM 2/3 en células MA104.** Las células MA104 se trataron o no con 500 UI/mL de IFN tipo I durante 12, 18 o 24 h. Se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. Se muestran los resultados de 1 ensayo representativo.

En las células MA104 tampoco se encontró expresión basal de IFITM 1; pero, a diferencia de IFITM 2/3, IFITM 1 no fue inducible por IFN tipo I en ninguno de los tiempos probados (Figura 9). Además, para asegurar que el anticuerpo contra IFITM 1 funcionaba, se utilizaron células HeLa tratadas o no con IFN tipo I (en las que se ha reportado la inducción de esta proteína mediante IFN tipo I<sup>[7]</sup>). En las células HeLa tratadas con IFN tipo I sí se observó la inducción de IFITM 1 (Figura 9), lo que nos permite concluir que IFITM 1 no se expresa en MA104 en las condiciones ensayadas.



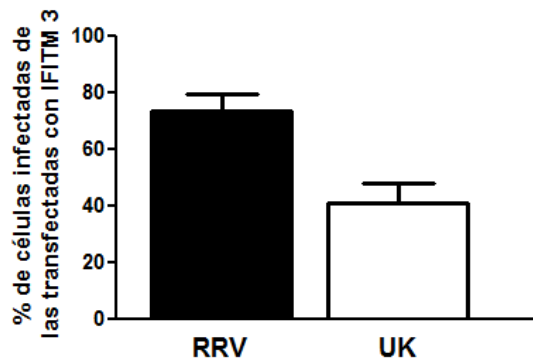
**Figura 9. El tratamiento con IFN tipo I no induce la expresión de IFITM 1 en células MA104.** Las células MA104 o HeLa se trataron con 500 UI/mL de IFN tipo I durante 18 h. Se evaluó el nivel de IFITM 1 mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. Se muestran los resultados de 1 ensayo representativo.

### **La sobreexpresión de IFITM 3 afecta diferencialmente la infectividad de RRV y de UK.**

El IFN tipo I regula la expresión de más de 1 000 genes, por lo que varios de ellos podrían estar relacionados con la susceptibilidad de un virus al IFN tipo I. Por lo anterior, es necesario evaluar si las IFITMs representan uno de los elementos capaces de bloquear la infección de UK pero no de RRV y por lo tanto, provocan los distintos fenotipos de susceptibilidad al IFN tipo I. Una de las estrategias para resolver el cuestionamiento anterior fue evaluar la infectividad de ambas cepas en células que sobreexpresen las IFITMs.

Al transfectar un plásmido que dirige la sobreexpresión de IFITM 3 en células MA104, y posteriormente infectar con RRV o con UK, encontramos que la infectividad de RRV disminuyó un 26%, mientras que la de la cepa UK decayó un 60%. Estos resultados sugieren que los diferentes fenotipos de susceptibilidad al IFN tipo I podrían estar ligados, al menos parcialmente a la IFITM 3 (Figura 10).



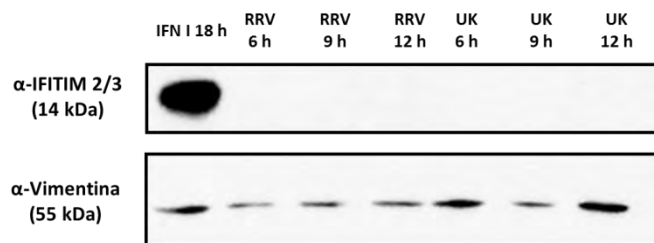


**Figura 10. La infectividad de UK es más susceptible a la sobreexpresión de la IFITM 3 que la de RRV.** Las células MA104 se transfectaron con plásmidos que codifican IFITM 3 y posteriormente se infectaron con RRV o UK durante 8 h a una MOI de  $10 \frac{UFF}{cel}$ . Se evaluó la infectividad de ambas cepas en las células que sobreexpresaban las IFITMs mediante inmunofluorescencia. Las barras indican el error estándar de la media de dos experimentos independientes (n=2).

### La infección con RRV o UK no induce la expresión de IFITM 2/3.

Se ha demostrado que los rotavirus son capaces de activar sensores como RIG-I y MDA-5 [42], los cuales, llevan a la producción del IFN tipo I *in vitro* [25, 58] y, consecuentemente, de varios ISGs. Por otro lado, se ha detectado un aumento en el nivel del IFN tipo I en el suero de niños infectados con rotavirus.[13] Dados estos antecedentes, quisimos evaluar si la infección con las cepas RRV o UK era capaz de inducir la expresión de IFITM 2/3 en las células MA104. Lo anterior se realizó infectando las células MA104 con RRV o UK por 6, 9 o 12 h y evaluando el nivel de IFITM 2/3 mediante ensayos de western blot.

En este caso, no se detectó expresión de IFITM 2/3 durante la infección con ninguna de las dos cepas de rotavirus, RRV o UK, a ninguno de los tiempos de infección probados (Figura 11).



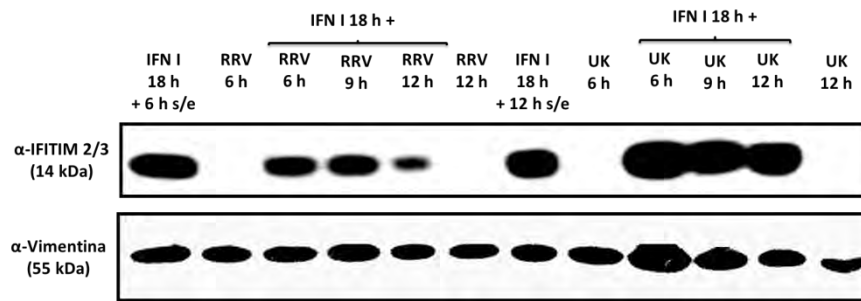
**Figura 11. La infección con RRV o UK no induce la expresión de IFITM 2/3 en células MA104.** Las células MA104 se infectaron RRV o UK durante 6, 9 o 12 h. Se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. Se muestran los resultados de 1 ensayo representativo.



## **La infección con RRV disminuye el nivel de IFITM 2/3 inducida por el IFN tipo I.**

Los ensayos de western blot mostraron que ni RRV ni UK eran capaces de inducir la expresión de IFITM 2/3 durante la infección. Sin embargo, debido a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que presentan los rotavirus, una pregunta importante era estudiar si las cepas RRV o UK tenían la capacidad de modular a IFITM 2/3 en células previamente estimuladas con IFN tipo I. Para responder la pregunta anterior, las células MA104 se trataron con IFN tipo I por 18 horas, posteriormente se infectaron con RRV o UK durante 6, 9 o 12 horas y se determinó el nivel de IFITM 2/3 presente en las células de las distintas condiciones, mediante western blot.

Los resultados mostraron que el nivel de IFITM 2/3 no se modificó considerablemente aún 12 horas después de quitar el estímulo con IFN tipo I (Figura 12, carril 7). Interesantemente, se encontró que durante la infección con RRV, los niveles de IFITM 2/3 disminuyeron notablemente en comparación con las células estimuladas con IFN tipo I sin infectar y que el efecto se incrementó conforme pasa el tiempo (Figura 12, carriles 3 a 5). Por otro lado, la infección con UK no modificó el nivel de esta proteína en los 3 tiempos probados (Figura 12, carriles 9 a 11). Esto indica que la infección con RRV y la infección con UK poseen un control distinto sobre los niveles de IFITM 2/3, lo que también podría estar relacionado con la diferente susceptibilidad al IFN tipo I.



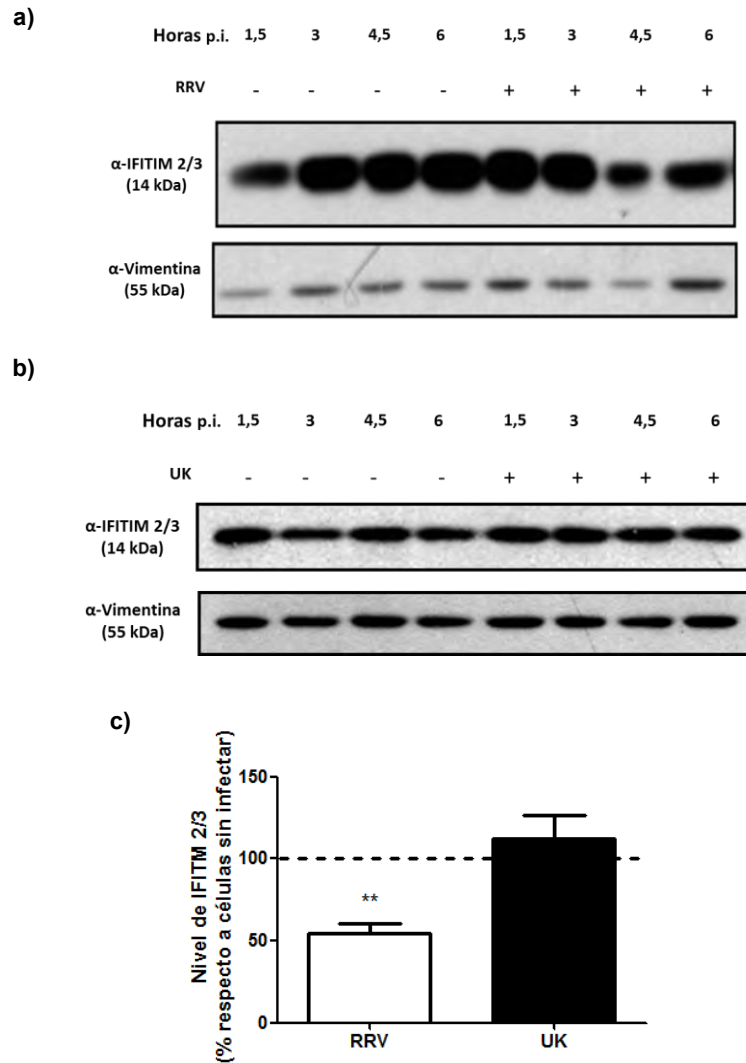
**Figura 12. La infección con RRV disminuye el nivel de IFITM 2/3 inducida por el IFN tipo I.** Las células MA104 se trataron con 500 UI/mL del IFN tipo I durante 18 h y/o se infectaron con RRV o UK durante 6, 9 o 12 h a una MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ . Se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. Se muestran los resultados de 1 ensayo representativo. s/e = sin estímulo con IFN tipo I

### **RRV disminuye significativamente el nivel de IFITM 2/3 en comparación con UK a partir de las 6 horas post-infección**

La cinética de infección a tiempos tardíos mostró que durante la infección con RRV el nivel de IFITM 2/3 comienza a disminuir a partir de las 6 h.p.i. Sin embargo, era interesante saber si la disminución comenzaba desde tiempos tempranos de la infección, ya que el efecto antiviral de las IFITMs es a nivel de entrada en la mayoría de los casos<sup>[1, 9, 17, 22, 48]</sup>.

Al evaluar el nivel de IFITM 2/3 en tiempos más cortos se encontró que la disminución de esta proteína durante la infección con RRV se volvía significativa a partir de las 6 h.p.i.; mientras que el nivel de IFITM 2/3 no se modificaba significativamente durante la infección con UK. A las 6 h.p.i., el nivel de IFITM 2/3 fue aproximadamente 57% para el caso de RRV y 124% para el caso de UK, en comparación con su respectivo control de células sin infectar (Figura 13).

Con base en los resultados anteriores se eligió el tiempo de 6 h.p.i. para realizar los siguientes ensayos.



**Figura 13. La infección con RRV disminuye significativamente el nivel de IFITM 2/3 inducida por el IFN tipo I desde las 6 h.p.i.** Las células MA104 se trataron con 500 UI/mL del IFN tipo I durante 18 h y/o se infectaron con RRV o UK durante 1,5; 3; 4,5 o 6 h a una MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ . Se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante western blot, utilizando vimentina como control de carga. **a)** Cinética representativa de RRV **b)** Cinética representativa de UK **c)** Comparación del nivel de IFITM 2/3 a las 6 h.p.i. con RRV o UK respecto a las células no infectadas (100%). Los valores representados como porcentajes fueron normalizados previamente con el control de carga. Las barras representan el error estándar de la media a de 5 ensayos independientes (n=5). \*\* p<0,05 vs células sin infectar.

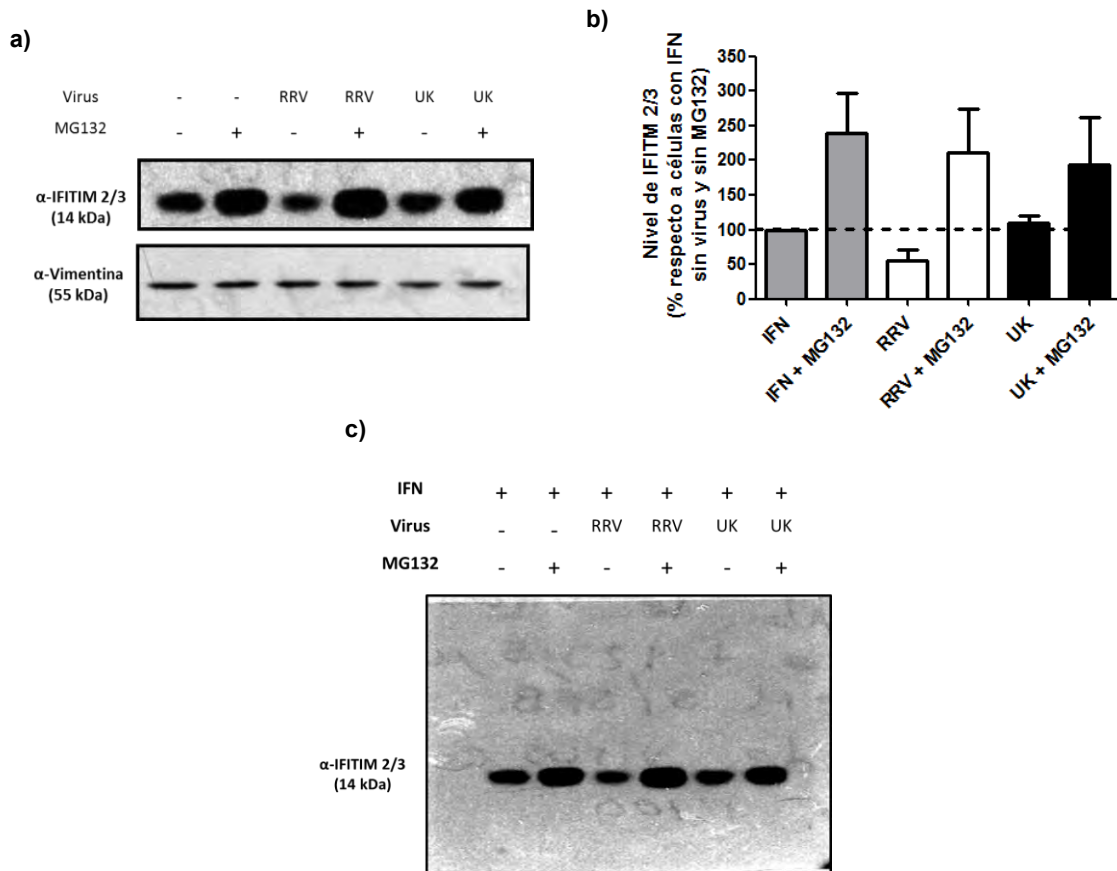


## **La inhibición del proteasoma bloquea la disminución de IFITM2/3 durante la infección con RRV.**

Las cinéticas de los niveles de IFITM2/3 durante la infección mostraron que RRV provocaba una disminución de dicha proteína. La siguiente pregunta por responder fue si esta disminución era debida a la inhibición de la síntesis de la proteína, o bien a la degradación de la proteína sintetizada. Una forma de saber si en la disminución de IFITM 2/3 había un componente de degradación era utilizar MG132, que es un péptido aldehído inhibidor de la actividad tipo quimiotripsina de la subunidad 20S del proteasoma <sup>[27]</sup>. El tratamiento de células con MG132 provoca la acumulación de las proteínas que se degradan vía proteasoma; por lo tanto, si IFITM 2/3 se degrada mediante proteasoma durante la infección con RRV, al agregar MG132 observaríamos que ésta permanecería estable, no así si la disminución es por inhibición de la síntesis de proteínas.

El MG132 (10  $\mu$ M) se colocó después de la adsorción del virus durante las 6 horas de infección y finalmente se realizó un western blot para detectar la proteína IFITM2/3. Como se observa en la figura 13, al tratar las células no infectadas con el MG132 hubo un incremento en el nivel de IFITM 2/3 (Figura 14a, carriles 1 y 2; figura 14b), lo cual indica que IFITM 2/3 se degrada vía proteasoma en condiciones normales y que tiene un tiempo de vida media corto. Cuando las células se infectan con RRV en ausencia de MG132, el nivel de IFITM 2/3 disminuye, como se ha observado anteriormente; sin embargo, en células infectadas con RRV y tratadas con MG132, el nivel de IFITM 2/3 aumentó hasta niveles similares a su contraparte sin infectar (Figura 14a, carriles 3 y 4; figura 14b). En el caso de la infección con UK, el MG132 también produjo un incremento del nivel de IFITM 2/3 similar al de las células sin infectar tratadas con IFN tipo I y MG132 (Figura 14a, carriles 5 y 6; figura 14b). Estos resultados, indican que la disminución de IFITM 2/3 durante la infección con RRV implica la degradación de la proteína a través del proteasoma.

Además, cabe destacar que durante los ensayos de inhibición del proteasoma no aparecieron bandas de pesos superiores al peso de IFITM 2/3 (14 kDa), que pudieran corresponder a la proteína ubiquitinada (Figura 14c). Lo anterior sugiere que la degradación proteasomal de la proteína es a través de un mecanismo distinto a la ubiquitinación.



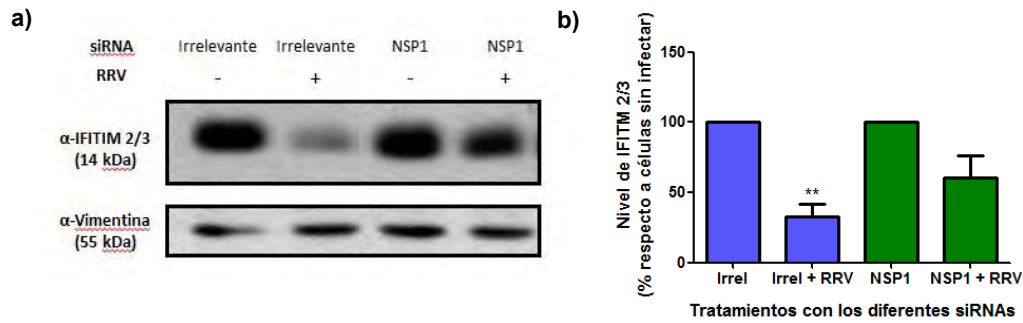
**Figura 14. El tratamiento con MG132 revierte la disminución del nivel de IFITM 2/3 que se observa durante la infección con RRV.** Las células MA104 se trataron con IFN tipo I (500 UI/mL) durante 18h. Posteriormente se infectó o no con RRV o UK (MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ ) y se trataron o no con MG132 10  $\mu$ M durante 6 h. Se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. **a)** Western blot representativo del nivel de IFITM 2/3 en las distintas condiciones. **b)** Comparación del nivel de IFITM 2/3 en las células infectadas y no infectadas, tratadas con MG132. La barras representa el error estándar de la media de 3 ensayos independientes (n=3). **c)** Film completo de un Western blot representativo, donde no se detectan bandas de pesos mayores que podrían corresponder a IFITM 2/3 ubiquitinada.



## **El silenciamiento de la proteína no estructural NSP1 incrementa el nivel de IFITM 2/3 durante la infección con RRV.**

Se ha reportado que los rotavirus son capaces de enviar varias proteínas de respuesta inmune a degradación mediante la proteína NSP1 [3, 5, 47, 57], por lo que decidimos evaluar si esta proteína se requiere para la degradación de IFITM 2/3 durante la infección con RRV. Para esto, se interfirió con la expresión de NSP1 mediante siRNAs dirigidos hacia el mensajero de dicha proteína. Las células se prepararon con los siRNAs durante 48 h y con IFN tipo I durante 18 horas previas a la infección con RRV (6 horas). Finalmente, se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante western blot.

En estos ensayos encontramos que al infectar con RRV las células tratadas con un siRNA irrelevante (siRNA irrel), el nivel de IFITM 2/3 cayó significativamente hasta aproximadamente 33% con respecto a las células control (tratadas con el siRNA irrel y no infectadas). Por otra parte, al silenciar NSP1 e infectar con RRV, el nivel de IFITM 2/3 disminuyó a 61% con respecto a las células que se trataron con el siRNA para NSP1 no infectadas (Figura 15b). Estos resultados muestran que al silenciar la expresión de NSP1 hubo una menor disminución de IFITM 2/3 comparada con las células tratadas con un siRNA irrelevante; sin embargo, el nivel de IFITM 2/3 no se recupera completamente con el siRNA para NSP1. Por lo anterior, estos ensayos no nos permitieron establecer claramente el papel de NSP1 en la disminución del nivel de IFITM 2/3 durante la infección de RRV. Vale la pena mencionar que en estos ensayos no fuimos capaces de cuantificar la eficiencia del silenciamiento de NSP1, ya que la proteína NSP1 de RRV tiene un tiempo de vida media corto<sup>[41]</sup> y no podemos detectarla por western blot, a menos que las células se traten con un inhibidor del proteasoma; lo cual interfiere con el fenotipo de disminución de IFITM 2/3. Por otra parte, estos ensayos no se realizaron con la cepa bovina UK dado que la secuencia del siRNA con el que contamos está dirigida contra una región de la cepa RRV que no es homóloga en la cepa UK.



**Figura 15. El silenciamiento de NSP1 incrementa el nivel de IFITM 2/3 durante la infección con RRV.** Las células MA104 se lipofectaron con siRNAs para NSP1 o irrelevantes (5  $\mu$ M) durante 48 h y 18 h antes de completar el tiempo de interferencia se colocó el IFN tipo I (500 UI/mL). A las 48 h de interferencia se infectó o no con RRV (MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ ) por 6 h. Se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. **a)** Western blot representativo del nivel de IFITM 2/3 en las distintas condiciones. **b)** Comparación del nivel de IFITM 2/3 en las distintas condiciones probadas. Las barras representan el error estándar de la media de 3 ensayos independientes (n=3). \*\* p<0,05 vs células sin infectar tratadas con su respectivo siRNA.

### La inducción de la degradación de IFITM 2/3 correlaciona con el origen del gen NSP1 de rotavirus.

Los ensayos de interferencia de NSP1 no nos permiten confirmar la participación de esta proteína en el fenotipo distinto de las cepas RRV y UK respecto al nivel de IFITM 2/3. Por lo anterior decidimos utilizar las rearreglantes de RRV y UK y así, determinar si hay correlación entre genotipo y fenotipo.

De una lista de rearreglantes entre las cepas UK y RRV (donadas por el Dr. Y Hoshino, del NIH), se seleccionaron aquellas con las combinaciones de genes que podrían ayudarnos a determinar si la capacidad de degradar IFITM 2/3 correlacionaba con NSP1 (Tabla 3). En estos ensayos, células pre-tratadas con IFN tipo I por 18 h se infectaron con las cepas RRV, UK, o las rearreglantes seleccionadas a una MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$  durante 6 h. Posteriormente, se evaluó el nivel de IFITM 2/3 presente mediante western blot.





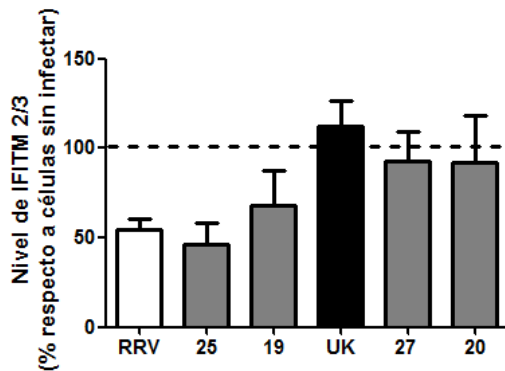
Tabla 3. Fenotipo de las rearreglantes utilizadas y sus cepas parentales.

Proteína	VP1	VP2	VP3	VP4	NSP1	VP6	VP7	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5 NSP6	Susceptibilidad a IFN
RRV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Resistente
UK	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	Susceptible
19.1.1.22.1 (19)	R	R	R	U	R	R	R	U	R	R	R	Susceptible
25.2.1 (25)	R	R	R	R	R	U	R	R	R	U	R	Resistente
27.2.1 (27)	R	R	R	R	U	U	R	R	R	R	R	Resistente
20.1.1 (20)	U	R	U	U	U	R	U	U	U	R	R	Susceptible

R = el gen proviene de RRV, U = el gen proviene de UK

Los resultados mostraron que las células infectadas con RRV poseen el 55% de IFITM 2/3 con respecto a las células sin infectar. Las rearreglantes 25 y 19, que poseen la NSP1 de RRV, también tendieron a provocar una disminución en el nivel de IFITM 2/3 (46% y 68%, respectivamente); sin embargo, la rearreglante 25 induce la degradación de IFITM 2/3 más eficientemente que la 19. Por el contrario, las rearreglantes 20 y 27 (92% cada una), que tienen la NSP1 de UK (112%), no modificaron significativamente el nivel de IFITM 2/3 con respecto a las células sin infectar (Figura 16).

Estos resultados mostraron que hay una tendencia a que las cepas que tienen la NSP1 de RRV pueden inducir la degradación de IFITM 2/3, mientras que las cepas que tienen la NSP1 de UK no poseen esta característica. Es decir, que la capacidad de provocar la degradación de IFITM 2/3 depende del origen parental de la proteína NSP1. En conjunto con los ensayos del silenciamiento de NSP1, estos resultados apoyan la idea de que NSP1 está relacionada con el fenotipo de disminución o no de IFITM 2/3 que presentan las diferentes cepas.



**Figura 16. La capacidad de degradación de IFITM 2/3 segrega con el gen NSP1.** Las células MA104 se trataron con IFN tipo I (500 UI/mL) por 18 h y se infectaron con RRV, UK o las rearreglantes durante 6 h (MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ ). Se evaluó el nivel de IFITM 2/3 mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. Se muestra el nivel de IFITM 2/3 como porcentaje respecto a las células sin infectar (100%). La barras representa el error estándar de la media de al menos 3 ensayos independientes (n = 3). 25 = 25.2.2, 19 = 19.1.1.22.1, 27 = 27.2.1, 20 = 20.1.1.

### La incapacidad de la NSP1 de UK de inducir la degradación de IFITM 2/3 no está asociada al nivel de proteína viral.

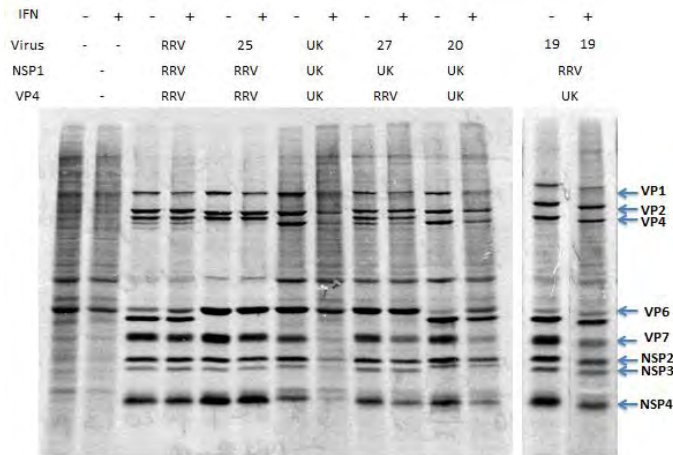
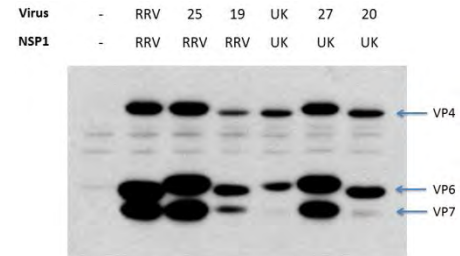
Los ensayos con las rearreglantes sugirieron que la proteína NSP1 de la cepa RRV, a diferencia de la cepa UK, tiene la capacidad de inducir la degradación de IFITM 2/3. Se sabe que la capacidad de las NSP1 de provocar la degradación de determinados blancos depende de cada cepa<sup>[3]</sup>, por lo que una posibilidad para explicar estos resultados es que la NSP1 de UK no posea los mecanismos necesarios para inducir la degradación de IFITM 2/3. Sin embargo, debido a que el IFN tipo I disminuye notablemente la infectividad de la cepa UK (Figura 6), otra posibilidad es que la síntesis de proteínas virales de UK sea menor a la de la cepa RRV y, por lo tanto, la cantidad de NSP1 producida no sea suficiente para observar la degradación de IFITM 2/3. Por otro lado, queríamos determinar si la baja eficiencia de la rearreglante 19 para provocar la degradación de IFITM 2/3 pudiera estar relacionada con una baja producción de NSP1. Para resolver estas preguntas se evaluó la síntesis de novo de proteínas virales en células tratadas o no con IFN tipo I e infectadas con RRV, UK o las distintas rearreglantes. Lo anterior se realizó en presencia de S<sup>35</sup>. Además, mediante western blot se analizaron las proteínas VP4, VP6 y VP7, utilizando un anticuerpo policlonal contra rotavirus (anticuerpo  $\alpha$ -TLPs), así como las proteínas NSP1 de RRV y UK con los anticuerpos  $\alpha$ -NSP1 RRV y  $\alpha$ -NSP1 UK.



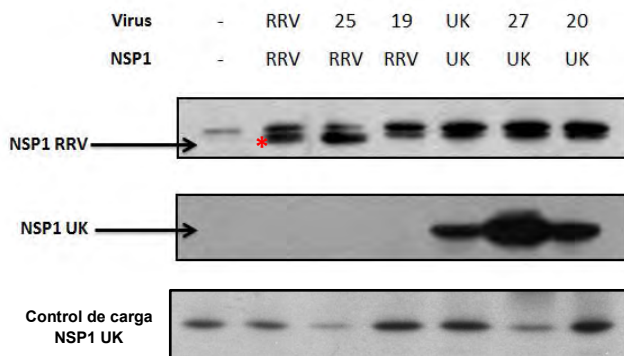
Los resultados mostraron que el tratamiento con IFN tipo I afectaba notablemente la síntesis de proteínas de los virus que poseen la proteína VP4 de UK (UK, 19 y 20), al igual que se observó con el anticuerpo  $\alpha$ -TLPs (Figura 17a, carriles 7,8, 11 a 14; figura 17b, carriles 4,5 y 7). Esto correlaciona con el hallazgo previo de que la susceptibilidad a IFN tipo I está asociada a VP4.

Con respecto a si la cantidad de NSP1 sintetizada por algunos de los virus es insuficiente para producir la degradación de IFITM 2/3, observamos que UK y la rearreglante 20 (en las cuales no observamos una disminución del nivel de IFITM 2/3), se encuentran dentro de las cepas susceptibles al IFN tipo I y que producen menor cantidad de proteína (Figura 18, NSP1 UK, carriles 5 y 7). Sin embargo, la rearreglante 27 que también tiene la NSP1 de UK, prácticamente no modifica su síntesis de proteínas por el IFN tipo I (Figura 17a, carriles 9 y 10) y presenta una mayor cantidad de NSP1 (Figura 18, NSP1 UK, carril 6) sin ser capaz de provocar la degradación de IFITM 2/3. Lo anterior nos permite sugerir preliminarmente que el hecho de que la NSP1 de UK no pueda inducir la degradación de IFITM 2/3 no es porque la cantidad de NSP1 sea insuficiente, sino por las diferencias en las proteínas NSP1s de RRV y UK.

Por otra parte, al analizar la NSP1 (RRV) mediante western blot, logramos detectar esta proteína tanto en RRV como en la rearreglante 25, pero no la detectamos en la rearreglante 19 (Figura 18, NSP1 RRV, carriles 2 a 4). Esto podría deberse a que ésta última es susceptible al tratamiento con IFN tipo I y, probablemente, la cantidad de NSP1 que produce es insuficiente para ser detectada. Además, esto podría explicar la menor eficiencia de la rearreglante 19 (en comparación con RRV y la rearreglante 25) para inducir la degradación de IFITM 2/3.

**a)**

**b)**


**Figura 17. La síntesis y el nivel total de proteínas virales no correlaciona con la capacidad de degradar IFITM 2/3.** Las células MA104 se trataron o no con IFN tipo I (500 UI/mL) durante 18h. Posteriormente se infectó o no con RRV, UK o las distintas rearreglantes (MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ ). **a)** A las 5 h.p.i. se colocó MEM con  $S^{35}$  y se continuó incubando hasta las 6 h.p.i. Se evaluó el nivel de proteína sintetizada de novo mediante SDS-PAGE y autorradiografía. Se muestra una autorradiografía representativa con las proteínas virales señaladas de lado derecho. **b)** A las 6 h.p.i. se cosecharon las células para evaluar proteína viral ( $\alpha$ -TLPs) mediante western blot.



**Figura 18. El nivel de NSP1 de UK no correlaciona con la capacidad de degradar IFITM 2/3.** Las células MA104 se trataron con IFN I (500 UI/mL) durante 18h. Posteriormente se infectó o no con RRV, UK o las distintas rearreglantes (MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ ) durante 6 horas. Se detectó la proteína NSP1 de RRV (cuadro superior, banda marcada con asterisco) o de UK (cuadro inferior) mediante western blot, utilizando proteínas inespecíficas como control de carga.

### RRV y UK no provocaron una disminución en el nivel de RNasa L y PKR.

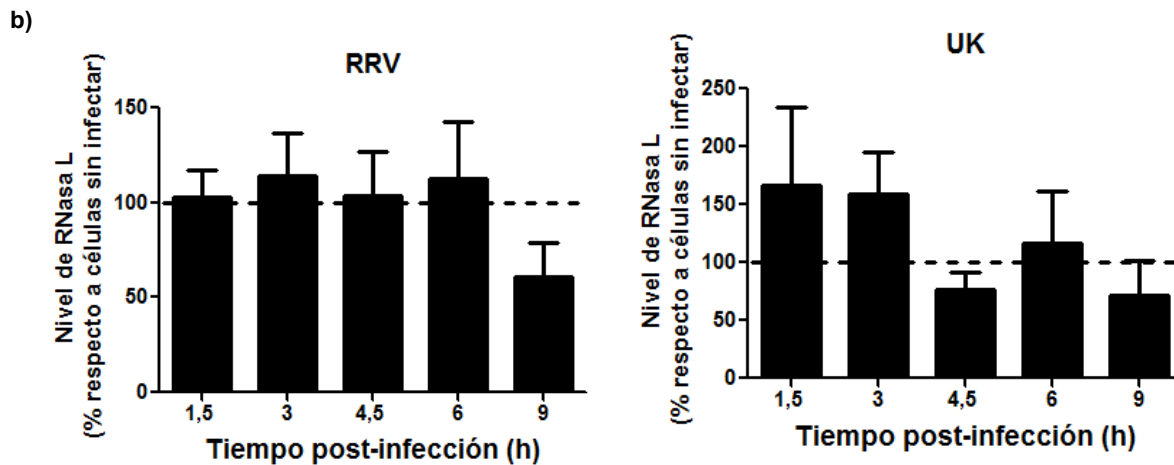
IFITM 2/3 es uno de muchos ISGs celulares. Por lo tanto, decidimos evaluar si la disminución en el nivel de IFITM 2/3 era un fenómeno particular de esta proteína o podría ser más general y observarse sobre otros ISGs. Aunque resolver esta pregunta requiere un estudio más completo, quisimos comenzar analizando dos de los ISGs que participan en la defensa contra rotavirus: la RNasa L y la proteína cinasa R (PKR)<sup>[56, 58, 64]</sup>, durante la infección con RRV o UK.



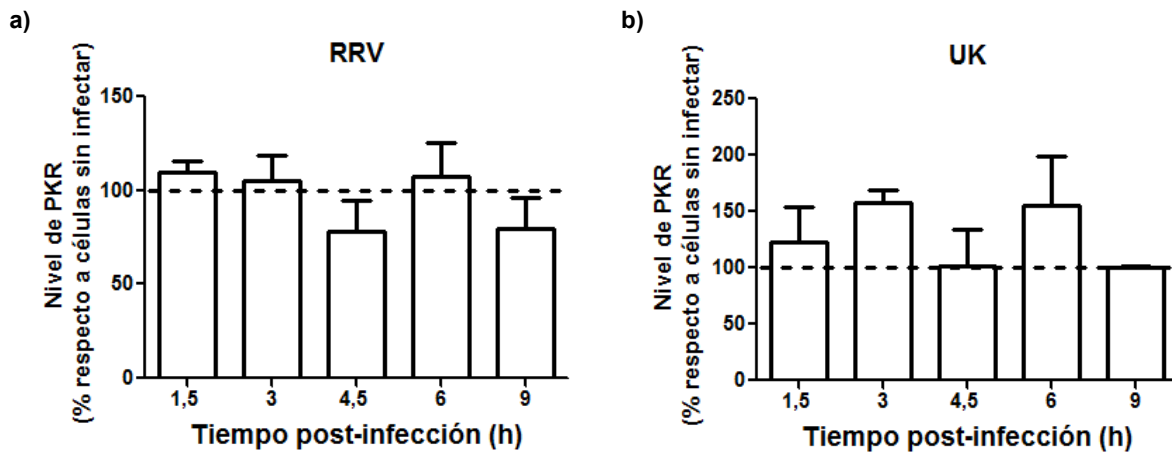
En estos ensayos encontramos que en la infección con la cepa RRV no se modificó el nivel de RNasa L durante las primeras 6 h.p.i. A las 9 h.p.i. se observó una ligera tendencia a disminuir el nivel de proteína (60% respecto a las células sin infectar); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En el caso de la cepa UK, tampoco se encontró diferencia significativa con las células sin infectar en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 19).

Al analizar el nivel de PKR durante la infección con RRV o UK encontramos que esta proteína tampoco se modificó significativamente durante las primeras 9 h.p.i. en ninguna de las dos cepas (Figura 20).

El hecho de que no se haya encontrado disminuida ninguna de las dos proteínas estimuladas por IFN, sugiere que la degradación de IFITM 2/3 observada durante la infección con RRV y que también se ha observado con otras proteínas de la respuesta inmunológica innata, no ocurre por un fenómeno general que afecte a todos los ISGs.



**Figura 19. El nivel de RNasa L no se modifica durante la infección con RRV o UK.** Las células MA104 se trataron con IFN tipo I (500 UI/mL) durante 18h. Posteriormente se infectó o no con RRV o UK (MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ ) durante 1,5, 3, 4,5, 6 o 9 h. Se evaluó el nivel de RNasa L mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. Se muestra el nivel de RNasa L como porcentaje respecto a las células sin infectar (100%). Las barras representa el error estándar de la media de 4 experimentos independientes (n=4) para RRV y 3 experimentos independientes para UK (n=3).



**Figura 20. El nivel de PKR no se modifica durante la infección con RRV o UK.** Las células MA104 se trataron con IFN tipo I (500 UI/mL) durante 18h. Posteriormente se infectó o no con RRV o UK (MOI de  $5 \frac{UFF}{cel}$ ) durante 1,5, 3, 4,5, 6 o 9 h. Se evaluó el nivel de PKR mediante el ensayo de western blot, utilizando vimentina como control de carga. Se muestra el nivel de PKR como porcentaje respecto a las células sin infectar (100%). Las barras representa el error estándar de la media de 3 experimentos independientes (n=3).



## Discusión

La respuesta inmune innata mediada por IFN tipo I es una de las respuestas celulares más importantes por su rapidez y eficiencia. En particular, la respuesta mediada por las IFITMs ha cobrado especial interés recientemente, debido a los últimos hallazgos que indican que estas proteínas son capaces de inhibir la entrada de una gran diversidad de virus [1, 7, 9, 17, 21, 66, 67]. En este proyecto tuvimos por objetivo estudiar el papel de las IFITMs como mecanismo de defensa antiviral contra dos cepas de rotavirus que se sabe que presentan una susceptibilidad diferencial a IFN tipo I.

El estudio realizado con la rearreglante 19 (que tiene los genes VP4 y NSP2 de UK y el resto de genes de RRV), permitió confirmar que la susceptibilidad a IFN tipo I está estrechamente asociada a la proteína VP4. Estos resultados abren la posibilidad de que el rotavirus RRV, a través de su proteína VP4, posea un mecanismo de evasión a la respuesta mediada por IFN tipo I y que la cepa UK no tenga este mecanismo. La hipótesis anterior es congruente con un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, donde se observó que cuando se lipofectan DLPs de RRV o de UK, ambos virus son susceptibles al tratamiento con IFN tipo I, lo cual sugiere que las proteínas de la capa externa son necesarias para la resistencia que presentan las TLPs de RRV [12]. Aunque aún falta explorar cuáles son los mecanismos involucrados, en el trabajo realizado por J. M. Carreño se realizó un primer acercamiento al estudiar la susceptibilidad a IFN tipo I de las cepas Nar 3, Nar 14 y Nar 18, las cuales son variantes de RRV con mutaciones puntuales en los aminoácidos 37 (Leu a Pro) y 267 (Tyr a Cys) de su VP4. Los resultados mostraron que estas variantes son susceptibles al tratamiento con IFN tipo I, sugiriendo que uno de estos dos aminoácidos (o los dos) podrían conferir la resistencia de RRV a IFN tipo I [12].



Por otra parte, dado que sabíamos que el proceso de entrada era importante en los diferentes fenotipos de susceptibilidad a IFN tipo I que observamos, decidimos explorar si las IFITMs podían tener un papel en este proceso. Esta pregunta nos llevó a identificar un nuevo posible blanco de la proteína NSP1 de rotavirus: las IFITMs. Se conocen varias proteínas que pueden ser degradadas por la NSP1 de los rotavirus, la mayor parte de ellas relacionadas con la respuesta inmunológica mediada por IFN tipo I; sin embargo, todas ellas tienen un papel importante en la primera respuesta, es decir, la que conlleva a la producción del IFN tipo I. Las IFITMs son las primeras proteínas conocidas que podrían ser degradadas a través de NSP1 y que tienen un papel en la segunda respuesta, es decir, la de los genes que se inducen cuando el IFN tipo I se une a su receptor y que tienen una acción antiviral directa.

El análisis realizado sobre la disminución de IFITM 2/3 indica que en este fenotipo hay un componente de degradación de IFITM 2/3 por NSP1 y que es a través de proteasoma. Sin embargo, no está completamente descartado que también pudiera haber algún tipo de inhibición previo a la traducción de la proteína. Para determinar si RRV impide la síntesis de las IFITMs, se podría evaluar el nivel de los mensajeros de las IFITMs en células no infectadas e infectadas con RRV.

El hecho de que RRV pueda provocar la degradación de IFITM 2/3 podría estar relacionado con que la sobreexpresión de IFITM 3 afecte la infectividad de UK pero no la de RRV; ya que es posible que la NSP1 de RRV esté interfiriendo con la función de esta proteína. Para saber si la hipótesis es correcta se podría evaluar el nivel de IFITM 3 por western blot en las células transfectadas e infectadas con RRV y con UK.

Aunque el silenciamiento de la proteína NSP1 de RRV no revirtió totalmente la disminución de IFITM 2/3, es posible que dicho silenciamiento no haya sido totalmente eficiente y la NSP1 remanente es capaz de mandar a degradar cierta cantidad de IFITM 2/3.





Los ensayos con las rearreglantes mostraron que la capacidad de degradar IFITM 2/3 segrega con NSP1 pero no con VP4, como ocurre con la susceptibilidad a IFN tipo I. Lo anterior indica que la susceptibilidad a IFN tipo I es un fenómeno independiente de la capacidad de degradar IFITM 2/3. Sin embargo, la cepa resistente a IFN tipo I (RRV) también es capaz de degradar IFITM 2/3 y la cepa susceptible (UK) no posee dicho mecanismo; así que es muy probable que la capacidad de RRV de degradar IFITM 2/3 esté contribuyendo a la resistencia global de esta cepa al IFN tipo I. Por otro lado, VP4 sí podría influir de manera indirecta en la capacidad de las cepas para degradar IFITM 2/3, ya que en el caso de la rearreglante 19 (con la VP4 de UK) podría ser que su menor eficiencia para degradar IFITM 2/3 se deba a que el tratamiento con IFN tipo I afecta la síntesis de las proteínas virales, entre ellas, la NSP1. Basados en estos resultados podemos concluir que las proteínas NSP1 y VP4 son dos mediadores con los que cuentan los rotavirus para contrarrestar la respuesta antiviral actuando por separado, pero que VP4 puede influir indirectamente en la acción de NSP1.

Aunque hasta ahora parece que la NSP1 de UK no es capaz de mandar a degradar IFITM 2/3, sería conveniente corroborar esta hipótesis y descartar que sea la deficiencia en la cantidad de proteína lo que lo impide. Una de las posibilidades es sobreexpresar la NSP1 de UK y evaluar si, aún en estas condiciones, NSP1 no es capaz de enviar a degradar IFITM 2/3.

Muchos de los mecanismos de acción propuestos para las IFITMs se limitan a un papel en la entrada de los virus [22, 38, 67]. Sin embargo, el hecho de que la disminución de los niveles de IFITM 2/3 al infectar con RRV ocurre aún a tiempos tardíos, podría sugerir que la acción de las IFITMs no está limitada a la entrada viral. Recientemente se encontró que las IFITMs interfieren con la replicación de HIV en pasos posteriores a la entrada, lo que apoya la idea de que las IFITMs podrían estar interfiriendo con algún paso distinto a la entrada de rotavirus [40, 62, 69]. Una forma de confirmar o descartar que las IFITMs actúen a un nivel posterior a la entrada sería evaluar la infectividad de DLPs en células que sobreexpresen las



IFITMs. Además, se ha visto que las partículas de HIV pueden incorporar IFITMs y que dichas partículas tienen una menor capacidad para infectar otras células blanco<sup>[62]</sup>, por lo que sería conveniente evaluar la infectividad de las partículas producidas (progenie viral) a partir de las DLPs.

En conjunto, estos resultados nos permitieron aprender acerca de un nuevo mecanismo de defensa viral contra la respuesta inmune innata de la célula y nos mostraron diferencias fenotípicas de respuesta viral hacia las defensas celulares entre las cepas RRV y UK. El rotavirus de simio RRV parece ser una cepa con gran capacidad para modular la respuesta inmunológica, mientras que UK no lo es, al menos en las células caracterizadas en este estudio. Esto podría tener relación con el origen de las cepas, ya que RRV proviene de simio, una especie más cercana al organismo de donde provienen las células MA104; mientras que UK es una cepa bovina. Además, se ha observado que la capacidad de NSP1 para degradar determinados blancos depende del tipo celular del que se trate; por ejemplo, la cepa UK no puede enviar a degradación el factor IRF3 en fibroblastos murinos, pero si lo puede hacer en fibroblastos de simio<sup>[57]</sup>. Otro factor a considerar es que no todas las proteínas NSP1s caracterizadas actúan sobre los mismos blancos. Se ha encontrado que las NSP1 de cepas porcinas envían a degradación al factor  $\beta$ -TrCP (que participa en la degradación de I $\kappa$ B para liberar a NF- $\kappa$ B y que éste se transloque a núcleo activando la transcripción del gen de IFN tipo I), en lugar de enviar a degradación a los factores IRFs que son blancos de la mayoría de las cepas de rotavirus<sup>[4]</sup>.

Este estudio corrobora que la resistencia o susceptibilidad a IFN tipo I es un fenómeno complejo que está influenciado por varios factores tanto virales como celulares, por lo que sería importante saber cuál es el mecanismo por el que la proteína VP4 de la cepa RRV es capaz de interferir con la mayor parte de la respuesta mediada por IFN tipo I.



Por otro lado, la proteína NSP1 ha sido muy estudiada por su capacidad de mandar a degradar varias proteínas de respuesta inmunológica, sería muy interesante conocer la lista total de blancos de NSP1 y saber qué características comparten dichos blancos, así como el mecanismo mediante el cual actúa.

**Modelos del diferente control de las cepas RRV y UK de rotavirus sobre la respuesta mediada por IFN tipo I, con base en los resultados del presente trabajo.**

En este proyecto se estudiaron dos cepas de rotavirus con un control muy diferente sobre la respuesta mediada por IFN tipo I: RRV y UK.

Cuando infectamos con la cepa RRV identificamos dos formas de control que no están presentes durante la infección con la cepa UK. El primer componente está asociado a su proteína VP4. Aunque se desconoce el mecanismo preciso por el que lo hace, una sugerencia es que la VP4 de RRV intervenga con algún paso de señalización común a varios de los ISGs y de esa se forma reduzcan los efectos del IFN tipo I. El segundo mecanismo está mediado por la proteína NSP1 de RRV, la cual induce la degradación de IFITM 2/3 a través del proteasoma. Lo anterior produce un menor nivel de IFITM 2/3 en la célula. Cabe destacar que el hecho de que durante la infección con UK no disminuya el nivel de IFITM 2/3, podría repercutir en la liberación de la partícula a citoplasma, ya que el principal sitio de localización de estas proteínas es en los endosomas tardíos, a partir de los cuales se liberan las DLPs de UK. Por otra parte, llama la atención que la degradación de IFITM 2/3 comience a tiempos tardíos de infección, lo que podría sugerir que estas proteínas intervienen en pasos del ciclo replicativo posteriores a la entrada. Una posibilidad es que al encontrarse también en otros organelos como el retículo endoplásmico, IFITM 2/3 pudieran intervenir en pasos de morfogénesis viral. En conjunto, estos mecanismos podrían ser parte de la causa de que RRV sea una cepa resistente y UK sea una cepa susceptible al tratamiento con IFN tipo I (Figuras 21 y 22).

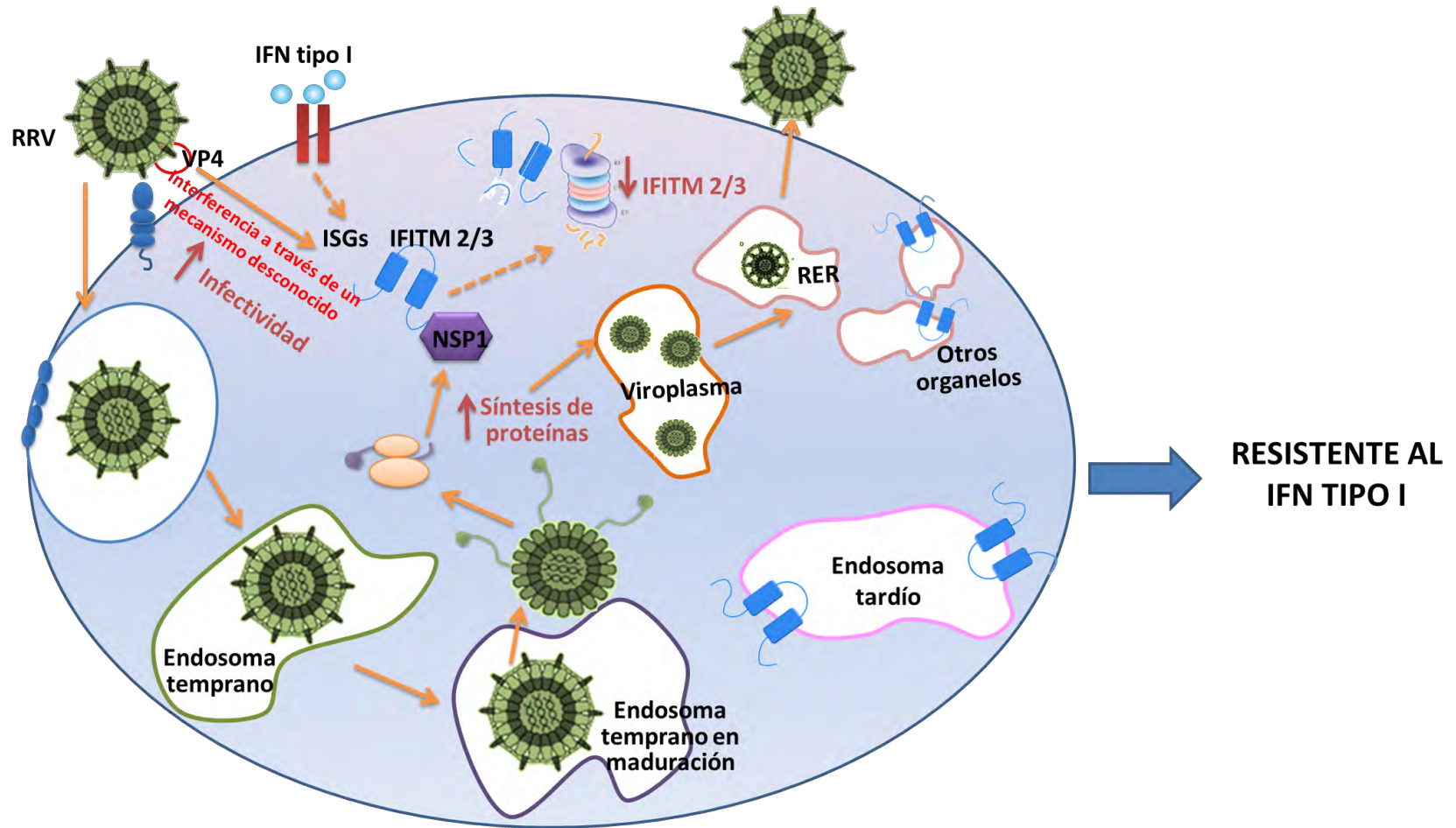


Figura 21. Efectos del IFN tipo I durante la infección de la cepa RRV. RER = Retículo endoplásmico rugoso

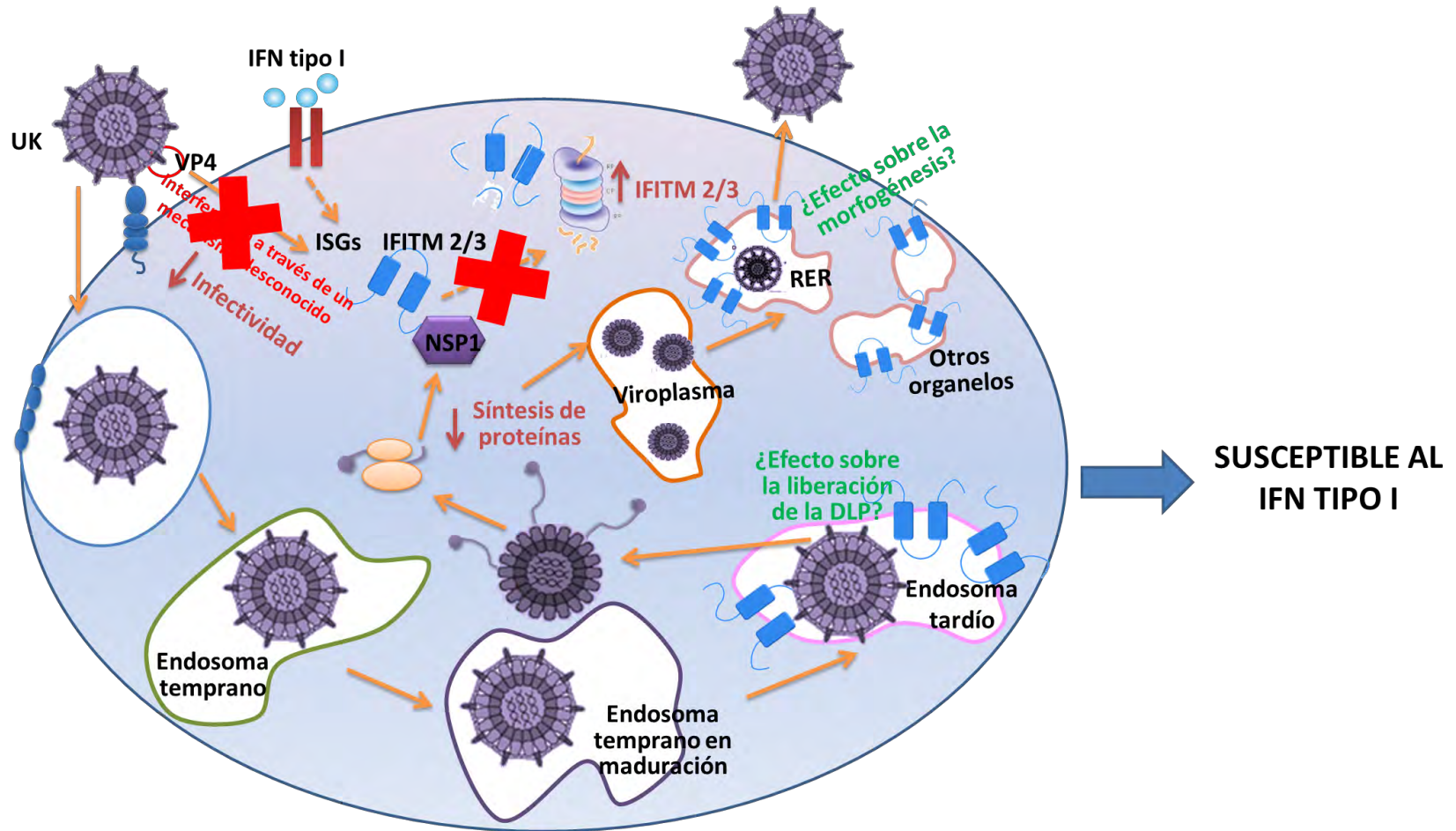


Figura 22. Efectos del IFN tipo I durante la infección de la cepa UK. RER = Reticulo endoplásmico rugoso



## Conclusiones

- Los rotavirus son capaces de controlar la respuesta inmune innata a través de al menos dos mecanismos diferentes pero que podrían actuar de forma sinérgica: El primero de ellos está asociado con la proteína de entrada VP4 y el segundo con la posible ubiquitín ligasa viral NSP1. Ambos sistemas dependen de la cepa de rotavirus que se caracterice y muy posiblemente también del origen de las células que se estudien.
- La proteína VP4 define la susceptibilidad de distintas cepas de rotavirus al IFN tipo I.
- La proteína NSP1 está asociada a la degradación de IFITM 2/3 a través del proteasoma.
- Las cepas RRV y UK presentan diferente capacidad de control de la respuesta inmunológica celular. RRV es resistente al IFN tipo I y es capaz de inducir la degradación de IFITM 2/3, UK es susceptible al IFN tipo I y no es capaz de provocar la degradación de IFITM 2/3.



## Perspectivas

- Determinar si la degradación de IFITM 2/3 requiere de su ubiquitinación.
- Verificar mediante ensayos de transfección si la proteína NSP1 de UK no es capaz de inducir la degradación de IFITM 2/3.
- Ampliar la búsqueda de blancos de NSP1.
- Dilucidar el mecanismo por el cual NSP1 induce la degradación de las distintas proteínas y qué caracteriza a dichas proteínas.



## Referencias

1. Anafu, A.A., et al., *Interferon-inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Restricts Reovirus Cell Entry*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(24): p. 17261-17271.
2. Arias, C.F., *Molecular Biology of Rotavirus Cell Entry*. Archives of Medical Research, 2001. **33**: p. 356-361.
3. Arnold, M.M. and J.T. Patton, *Diversity of Interferon Antagonist Activities Mediated by NSP1 Proteins of Different Rotavirus Strains*. Journal of Virology, 2010. **85**(5): p. 1970-1979.
4. Arnold, M.M., et al., *The battle between rotavirus and its host for the control of the interferon signaling pathway*. PLOS Pathogens, 2013. **9**(1).
5. Bagchi, P., et al., *Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NFκB activation by interacting with TNF receptor associated factor 2*. Virology, 2013. **444**(1-2): p. 41-44.
6. Bailey, C.C., et al., *IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense*. Annual Review of Virology, 2014. **1**(1): p. 261-283.
7. Baric, R.S., et al., *Distinct Patterns of IFITM-Mediated Restriction of Filoviruses, SARS Coronavirus, and Influenza A Virus*. PLoS Pathogens, 2011. **7**(1): p. e1001258.
8. Barro, M. and J.T. Patton, *Rotavirus NSP1 Inhibits Expression of Type I Interferon by Antagonizing the Function of Interferon Regulatory Factors IRF3, IRF5, and IRF7*. Journal of Virology, 2007. **81**(9): p. 4473-4481.
9. Basler, C.F., et al., *IFITM3 Restricts Influenza A Virus Entry by Blocking the Formation of Fusion Pores following Virus-Endosome Hemifusion*. PLoS Pathogens, 2014. **10**(4): p. e1004048.
10. Bhanja Chowdhury, J., et al., *Hepatitis C Virus Infection Modulates Expression of Interferon Stimulatory Gene IFITM1 by Upregulating miR-130A*. Journal of Virology, 2012. **86**(18): p. 10221-10225.
11. Brass, A.L., et al., *The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1243-1254.
12. Carreño, J.M., *Caracterización de la infección de rotavirus en células MA104 estimuladas con IFN tipo I y evaluación de la permisividad de distintas líneas celulares a la infección*. 2014, Universidad Nacional Autónoma de México: Cuernavaca.
13. D. De Boissieu, P.L., J. Badoual, Y. Bompard and C. Dupont, *Rotavirus induces alpha Interferon release in children with gastroenteritis*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1993. **16**: p. 29-32.
14. Der, S., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha , beta , or gamma using oligonucleotide arrays*. PNAS, 1998. **95**: p. 15623-15628.
15. Desselberger, U., *Rotaviruses*. Virus Research, 2014. **190**: p. 75-96.
16. Diamond, M.S. and M. Farzan, *The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins*. Nature Reviews Immunology, 2012. **13**(1): p. 46-57.
17. Diamond, M.S., et al., *IFITM3 Inhibits Influenza A Virus Infection by Preventing Cytosolic Entry*. PLoS Pathogens, 2011. **7**(10): p. e1002337.





18. Diaz-Salinas, M.A., et al., *The Spike Protein VP4 Defines the Endocytic Pathway Used by Rotavirus To Enter MA104 Cells*. Journal of Virology, 2012. **87**(3): p. 1658-1663.
19. Diaz-Salinas, M.A., et al., *Rotaviruses Reach Late Endosomes and Require the Cation-Dependent Mannose-6-Phosphate Receptor and the Activity of Cathepsin Proteases To Enter the Cell*. Journal of Virology, 2014. **88**(8): p. 4389-4402.
20. Dunn, S.J., T.L. Cross, and H.B. Greenberg, *Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization*. Virology, 1994. **203**: p. 178-183.
21. Emerman, M., et al., *IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion*. PLoS Pathogens, 2013. **9**(1): p. e1003124.
22. Feeley, E.M., et al., *IFITM3 Inhibits Influenza A Virus Infection by Preventing Cytosolic Entry*. PLoS Pathogens, 2011. **7**(10): p. e1002337.
23. Feng, N., et al., *Roles of VP4 and NSP1 in Determining the Distinctive Replication Capacities of Simian Rotavirus RRV and Bovine Rotavirus UK in the Mouse Biliary Tract*. Journal of Virology, 2010. **85**(6): p. 2686-2694.
24. Fitzgerald, M.E., et al., *An evolving arsenal: viral RNA detection by RIG-I-like receptors*. Current Opinion in Microbiology, 2014. **20**: p. 76-81.
25. Frias, A.H., et al., *Intestinal epithelia activate anti-viral signaling via intracellular sensing of rotavirus structural components*. Mucosal Immunology, 2010. **3**(6): p. 622-632.
26. Glass, R.I., *New hope for defeating rotavirus*. Scientific American, 2006: p. 47-55.
27. Goldberg, D.H.L.a.A.L., *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists*. Trends in cell biology, 1998. **8**: p. 397-403.
28. Goubau, D., S. Deddouche, and C. Reis e Sousa, *Cytosolic Sensing of Viruses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 855-869.
29. Graff, J.W., et al., *Interferon Regulatory Factor 3 Is a Cellular Partner of Rotavirus NSP1*. Journal of Virology, 2002. **76**(18): p. 9545-9550.
30. Gutierrez, M., et al., *Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis*. Journal of Virology, 2010. **84**(18): p. 9161-9169.
31. Hoffmann, H.-H., W.M. Schneider, and C.M. Rice, *Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions*. Trends in Immunology, 2015. **36**(3): p. 124-138.
32. Holloway, G. and B.S. Coulson, *Innate cellular responses to rotavirus infection*. Journal of General Virology, 2013. **94**(Pt\_6): p. 1151-1160.
33. Holloway, G., et al., *Rotavirus inhibits IFN-induced STAT nuclear translocation by a mechanism that acts after STAT binding to importin-alpha*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 8): p. 1723-33.
34. Joel W. Graff., K.E., Michele E. Hardy, *Rotavirus NSP1 Inhibits NFkB Activation by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of b-TrCP: A Novel Mechanism of IFN Antagonism*. Plos Pathogens, 2009. **5**(1).
35. Jourdan, N., et al., *Rotavirus Is Released from the Apical Surface of Cultured Human Intestinal Cells through Nonconventional Vesicular Transport That Bypasses the Golgi Apparatus*. Journal of Virology, 1997. **71**(11): p. 8268-8278.
36. Knipe, D.M., *Fields Virology*. 6 ed. 2013, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
37. Leib, D.A., et al., *MAVS Protein Is Attenuated by Rotavirus Nonstructural Protein 1*. PLoS ONE, 2014. **9**(3): p. e92126.
38. Li, K., et al., *IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion*. PLoS Pathogens, 2013. **9**(1): p. e1003124.



39. Loo, Y.-M. and M. Gale, *Immune Signaling by RIG-I-like Receptors*. *Immunity*, 2011. **34**(5): p. 680-692.
40. Lu, J., et al., *The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection*. *Journal of Virology*, 2010. **85**(5): p. 2126-2137.
41. Martínez, L. and L. Padilla, *The shift from low to high non-structural protein 1 expression in rotavirus-infected MA-104 cells*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013. **108**(4): p. 421-428.
42. Meng, X.-J., D. Uzri, and H.B. Greenberg, *Characterization of Rotavirus RNAs That Activate Innate Immune Signaling through the RIG-I-Like Receptors*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(7): p. e69825.
43. Montero, H., et al., *Rotavirus Infection Induces the Phosphorylation of eIF2 but Prevents the Formation of Stress Granules*. *Journal of Virology*, 2007. **82**(3): p. 1496-1504.
44. Morelli, M., A.F. Dennis, and J.T. Patton, *Putative E3 Ubiquitin Ligase of Human Rotavirus Inhibits NF- $\kappa$ B Activation by Using Molecular Mimicry To Target  $\beta$ -TrCP*. *mBio*, 2015. **6**(1): p. e02490-14.
45. Morelli, M., K.M. Ogden, and J.T. Patton, *Silencing the alarms: Innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3*. *Virology*, 2014: p. 1-10.
46. Murphy, K., *Inmunobiología de Janeway*. 7 ed. 2008, México: Mc Graw Hill Interamericana.
47. Nandi, S., et al., *MAVS protein is attenuated by rotavirus nonstructural protein 1*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(3): p. e92126.
48. Narayana, S.K., et al., *The Interferon-induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry*. *Journal of Biological Chemistry*, 2015. **290**(43): p. 25946-25959.
49. Organization, W.H. *Rotavirus infections*. 2014 1 de abril de 2014]; Available from: [http://www.who.int/topics/rotavirus\\_infections/en/](http://www.who.int/topics/rotavirus_infections/en/).
50. Parashar, U.D., *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. *Emerging Infectious Diseases*, 2006. **12**(2): p. 304-306.
51. Pasavento, J.B., *Rotavirus Proteins. Structure and Assembly*. CTMI, 2006. **309**: p. 189–219.
52. Perreira, J.M., et al., *IFITMs Restrict the Replication of Multiple Pathogenic Viruses*. *Journal of Molecular Biology*, 2013. **425**(24): p. 4937-4955.
53. Qian, J., et al., *Primate lentiviruses are differentially inhibited by interferon-induced transmembrane proteins*. *Virology*, 2015. **474**: p. 10-18.
54. Qin, L., et al., *Rotavirus nonstructural protein 1 antagonizes innate immune response by interacting with retinoic acid inducible gene I*. *Virology Journal*, 2011. **8**(1): p. 526.
55. Randall, R.E. and S. Goodbourn, *Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures*. *Journal of General Virology*, 2008. **89**(1): p. 1-47.
56. Sánchez-Tacuba, L., et al., *Rotavirus controls the activation of the OAS/RNase L pathway using at least two distinct mechanisms*. *Journal of Virology*, 2015: p. JVI.01874-15.
57. Sen, A., et al., *IRF3 Inhibition by Rotavirus NSP1 Is Host Cell and Virus Strain Dependent but Independent of NSP1 Proteasomal Degradation*. *Journal of Virology*, 2009. **83**(20): p. 10322-10335.
58. Sen, A., et al., *The Early Interferon Response to Rotavirus Is Regulated by PKR and Depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3*. *Journal of Virology*, 2011. **85**(8): p. 3717-3732.



59. Sen, A., et al., *Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation*. J Virol, 2014. **88**(1): p. 41-53.
60. Smith, S.E., et al., *IFITM proteins—cellular inhibitors of viral entry*. Current Opinion in Virology, 2014. **4**: p. 71-77.
61. Taniguchi, K., K. Kojima, and S. Urasawa, *Nondefective Rotavirus Mutants with an NSP1 Gene Which Has a Deletion of 500 Nucleotides, Including a Cysteine-Rich Zinc Finger Motif-Encoding Region (Nucleotides 156 to 248), or Which Has a Nonsense Codon at Nucleotides 153 to 155*. Journal of Virology, 1995. **70**(6): p. 4125-4130.
62. Tartour, K., et al., *IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity*. Retrovirology, 2014. **11**(1).
63. Trask, S.D., S.M. McDonald, and J.T. Patton, *Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication*. Nature Reviews Microbiology, 2012. **10**(3): p. 165-177.
64. Vijay-Kumar, M., et al., *Protein Kinase R Mediates Intestinal Epithelial Gene Remodeling in Response to Double-Stranded RNA and Live Rotavirus*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(10): p. 6322-6331.
65. Wee, Y.S., et al., *Interferon-inducible transmembrane proteins of the innate immune response act as membrane organizers by influencing clathrin and v-ATPase localization and function*. Innate Immunity, 2012. **18**(6): p. 834-845.
66. Wilkins, C., et al., *IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry*. Hepatology, 2013. **57**(2): p. 461-469.
67. Wrensch, F., M. Winkler, and S. Pöhlmann, *IFITM Proteins Inhibit Entry Driven by the MERS-Coronavirus Spike Protein: Evidence for Cholesterol-Independent Mechanisms*. Viruses, 2014. **6**(9): p. 3683-3698.
68. Xie, M., et al., *Human Cytomegalovirus Exploits Interferon-Induced Transmembrane Proteins To Facilitate Morphogenesis of the Virion Assembly Compartment*. Journal of Virology, 2015. **89**(6): p. 3049-3061.
69. Yu, J., et al., *IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein*. Cell Reports, 2015. **13**(1): p. 145-156.
70. Zhao, X., et al., *Interferon induction of IFITM proteins promotes infection by human coronavirus OC43*. PNAS, 2014. **111**(18): p. 6756-6761.
71. Zhou, R., et al., *Recognition of Double-Stranded RNA by TLR3 Induces Severe Small Intestinal Injury in Mice*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(7): p. 4548-4556.



## Anexo I.

El presente trabajo se presentó en el IX Congreso Nacional de Virología con el apoyo otorgado por el PAEP.



## IX Congreso Nacional de Virología



La Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus,  
de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

otorga la presente

**CONSTANCIA**

a:

**Valencia Camargo Alma Delia**

Por su participación como

**PONENTE**

en el IX Congreso Nacional de Virología

Morelos, México del 22 al 25 de septiembre de 2015.

COMITÉ ORGANIZADOR

Pavel Isa- IBT UNAM

Elizabeth Loza Rubio- INIFAP

Ramón A. Gonzalez- CIDC UAEM