



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACIÓN DIFERENCIAL DEL GEN
INTERFERÓN EN CÉLULAS INFECTADAS CON EL
VIRUS DE INFLUENZA ESTACIONAL Y
PANDÉMICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ANGÉLICA MONSERRAT ORTIZ ÁLVAREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ELIZABETH CASTILLO VILLANUEVA
2017**

Ciudad Universitaria, CDMX 2017



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.

1. Datos del alumno

Ortiz

Álvarez

Angélica Monserrat

55 85 61 09 33

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

308115273

2. Datos del asesor

Dra.

Elizabeth

Castillo

Villanueva

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Víctor Manuel

Valdés

López

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Beatriz

Gómez

García

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevsky

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Benito

Estrada

Mena

7. Datos de la tesis

Regulación diferencial del gen Interferón en células infectadas
con el virus de influenza estacional y pandémica.

50p

2017

Cuando tienes miedo, pero de todas formas lo haces, eso es valentía.

-Coraline, Neil Gaiman

A mis padres, que han dado todo por mí.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Paz Eugenia Álvarez Enciso y Ángel Ortiz Guzmán, por estar siempre conmigo, por creer en mí, guiarme, impulsarme y no dejarme caer. Por todos los esfuerzos realizados para darme lo mejor. Por las noches en vela, los regaños y las felicitaciones; los juegos, los viajes, los libros y las risas. Por todo, ¡gracias! Gracias a ustedes he llegado hasta aquí y sin su apoyo jamás lo habría logrado. ¡Los amo!

A la Doctora Elizabeth Castillo Villanueva, por brindarme la mano cuando más lo necesité, por permitirme realizar el servicio social y el presente trabajo contigo. Por todos los consejos, tiempo y conocimientos compartidos.

A Rafa, por acompañarme en este camino que definitivamente habría sido más difícil si no contara con tu apoyo, tu amistad y tus consejos. Por estar conmigo en los momentos más difíciles y regresarme a la realidad cuando mis miedos eran más grandes que mi ser.

A Juan, por las experiencias vividas y que han creado un lazo entre nosotros, por enseñarme a tener esperanza aun cuando parecía imposible, por tu energía, y por siempre buscar una solución.

A Nuria, Ivonne y Mariel, por acompañarme a lo largo de la carrera, por el tiempo, alegrías y tristezas compartidas.

A Vero, por el corto tiempo de conocernos, pero el gran aprendizaje que hemos adquirido con los jalones de oreja; por compartir experiencias, por inspirarme y ser un ejemplo de lucha.

A la Doctora Beatriz Gómez, por permitir la realización del presente trabajo en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina, por las charlas, los consejos y su apoyo.

A mis sinodales: Dr. Víctor Manuel Valdés López, Dra. Beatriz Gómez García, Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevsky y Dr. Benito Estrada Mena, por aceptar formar parte de mi jurado, sus correcciones y comentarios hacia este trabajo.

A mis padrinos, María Petra Álvarez y Francisco Ángeles, y a mis primos, Haydet Ángeles, Erika Ángeles y Guillermo Guarneros, por abrirme las puertas de su hogar y brindarme su apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por albergarme y formarme desde mis estudios en la ENP 9, hasta el término del presente trabajo. A la Facultad de Ciencias y a todos los profesores que han influido en mi formación académica.

CONTENIDO

CONTENIDO	I
LISTA DE FIGURAS	III
ABREVIATURAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Clasificación	1
1.2. Generalidades del virus Influenza.....	1
1.3. Cuadro clínico	2
1.4. Estructura y composición de la partícula viral.....	2
1.5. Estructura del genoma viral.....	3
1.6. Ciclo de replicación viral.....	6
1.6.1. Adsorción:.....	6
1.6.2. Endocitosis y desencapsidación	6
1.6.3. Translocación de las vRNP hacia el núcleo celular:	6
1.6.4. Replicación y transcripción.....	7
1.6.5. Ensamblaje.....	7
1.6.6. Liberación del virión.....	8
1.7. Zoonosis viral	8
1.8. Patogénesis	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Respuesta antiviral de la célula.....	10
2.2. Generalidades del interferón	10
2.3. Activación del factor de transcripción IRF-3 durante la infección viral	11
2.4. Generalidades de la proteína no estructural NS1 del virus de la Influenza..	13
2.4.1. Estructura de la proteína viral NS1	13
2.4.2. Funciones de la NS1	14
2.5. Generalidades de los cuerpos PML (PML-NBs) y la maquinaria de SUMOilación celular.....	17
2.5.1. Sistema de SUMOilación celular	17
2.5.2. Mecanismo de SUMOilación celular	18
2.6. Diálogo molecular entre los componentes del virus de la nfluenza y el sistema de SUMOilación celular.	19
2.7. Fosforilación y SUMOilación de IRF-3 durante la infección	20

3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos particulares	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Células y virus	22
5.2. Extracción y purificación de proteínas totales.....	23
5.3. Fraccionamiento celular	23
5.4. Inmunodetección de proteínas por SDS-PAGE y Western-blot	24
5.5. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	25
5.6. RT-PCR en tiempo real (Taqman).....	25
6. RESULTADOS	27
6.1. El factor de transcripción IRF-3 es modificado diferencialmente por la unión de SUMO1 durante la infección por influenza H1N1 estacional y pandémica 27	
6.2. La proteína viral NS1 interacciona con IRF-3 en diferentes compartimientos celulares	29
6.3. La SUMOilación de IRF-3 se correlaciona con una menor expresión de IFN- β 31	
7. DISCUSIÓN.....	34
8. CONCLUSIONES	36
9. REFERENCIAS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema que ilustra la estructura del virus de influenza.....	2
Figura 2 Representación esquemática de la organización del genoma de Influenza virus.....	5
Figura 3 Ciclo de replicación del virus de Influenza.....	8
Figura 4 Proteína NS1 en donde se muestran los dominios y el residuo 196 que presenta ácido glutámico.....	13
Figura 5 Alineamiento de las secuencias primarias de la proteína NS1 de la cepa estacional (A/New Caledonia/20/99) (AFO65032.1) y la cepa pandémica (A/Mexico/09) (ACY77989.1).....	14
Figura 6 Inmunodetección de las proteínas celulares IRF-3, p-IRF-3, GAPDH como control de carga y de la proteína viral NS1, como control de infección ..	21
Figura 7 Distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3 (verde) y SUMO-1 (rojo), en células A549 infectadas con el virus de Influenza H1N1 estacional (A/New Caledonia/20/99) y pandémico (A/Mexico/09)	21
Figura 8 Modificación de la proteína IRF-3 por la unión de SUMO-1 durante la infección por influenza H1N1 pandémica o estacional.	29
Figura 9 A) Cuantificación de SUMO-IRF-3 y B) cuantificación de la expresión del mensajero de IFN- β . A).	33

ABREVIATURAS

A549	Células alveolares de adenocarcinoma humano epitelial tipo II
AP-1	Proteína activadora-1
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
Cardif	CARD adaptador e inductor de INF- β
CBP	Proteína de unión a CREB
cDNA	DNA complementario
CPSF30	Factor de especificidad de escisión y poliadenilación 30
DGE	Dirección General de Epidemiología
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
E	Ácido glutámico
E1/(SAE1-SAE2)	Enzima de activación de SUMO
E2/Ubc9	Enzima de conjugación a SUMO
E3	Enzima de ligación
ED	Dominio efector
eIF4GI	Factor de inicio de la transcripción en eucariontes 4G1
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HA	Hemaglutinina
Hpi	Horas post-infección
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IFN	Interferón
ifnb	Gen del interferón-beta: <i>ifnb gene</i>
IFN-I	Interferón tipo I (α/β)
IFN-II	Interferón tipo II (λ)
IFN-III	Interferón tipo III (γ)
IP	Inmunoprecipitación
IP3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
IP-S	Estimulador-1 del promotor de interferón
IRF	Familia de proteínas denominadas: Factores reguladores de interferón
IRF-3	Factor 3 de regulación del interferón
IRF3-P	Factor de regulación del interferón 3 fosforilado
ISGs	Genes antivirales estimulados por el interferón
ISRE	Elemento de Respuesta al estímulo de interferón
K	Lisina
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacáridos
M1/2	Proteína de matriz
MAVS	Proteína de señalización antiviral mitocondrial
MDA-5	Gen 5 de diferenciación asociado al melanoma
MDCK	Células de riñón de perro con características de epitelio tubular y carcinoma papilar
μg	Microgramos
μL	Microlitros

NA	Neuraminidasa
NES	Señal de exportación nuclear
NFkB	Factor nuclear kappa B
Ng	Nanogramos
NK	Células <i>Natural Killer</i> : asesinas naturales
NLS	Señal de localización nuclear
NoLS	Señal de localización nucleolar
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural 1
ORF	Marco de lectura abierto
2'-5'-OAS	2'-5'-oli-goadenilato sintetasas
PA	Polimerasa ácida
PABP (I/II)	Proteína de Unión a cola de poli A (I/II)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB1/PB2	Polimerasa Básica
pcDNA	DNA plasmídico
pDCs	Células dendríticas plasmocitoides
PFU	Unidades formadoras de placa
PKR	Proteína Cinasa R
PML	Proteína de la Leucemia Promielocítica
PML-NBs	Cuerpos de PML
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RBD	Dominio de unión a RNA
RIG-I	Gen-1 inducible por ácido retinoico
RLR	Receptores RNA helicasas inducibles por ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_{ds}	RNA de doble cadena
RNA_m	RNA mensajero
RNA_{ss}	RNA de cadena sencilla
RNA_v	RNA genómico viral
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Serina
SENPs	Proteasas específicas para SUMO
Sia	Ácido siálico
ssRNA⁻	Cadena sencilla de RNA de polaridad negativa
STAT	de <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUMO	de <i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
TBK1	Cinasa de unión a TANK
TLR	Toll-like receptor: Receptor tipo Toll
VISA	Adaptador viral de la inducción de la señal VISA
vRdP	RNA-polimerasa viral dependiente de RNA
vRNPs	Ribonucleoproteínas virales
WHO	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

Los virus de influenza han afectado a la humanidad por cientos de siglos; se cree que éstos fueron los causantes de la epidemia descrita por Hipócrates en el 412 a.C. Estos virus aún siguen siendo causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, afectando cada año a grandes segmentos de la población. Asimismo, muchas especies animales se ven afectadas por estos virus y algunos de estos pueden causar pandemias como el caso de la pandemia del 2009 (Shaw & Palese, 2013).

1.1. Clasificación

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* que según el ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), los describe como virus de RNA, envueltos con cápsides cuya simetría es helicoidal. Su genoma está constituido por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla de polaridad negativa y pertenecen al grupo V de la clasificación de Baltimore (Flint, Enquist, Racaniello, & Skalka, 2015; Shaw & Palese, 2013).

David Baltimore clasificó a los virus según su material genético, dejando a los virus de la familia *Orthomyxoviridae* dentro del grupo V, el cual es descrito como virus con genoma segmentado de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (ssRNA⁻) (Flint et al., 2015; Shaw & Palese, 2013; Wright, Neumann, & Kawaoka, 2013).

A diferencia de otros virus con genomas de RNA cuyo ciclo de replicación viral ocurre en el citoplasma de las células hospedadoras, el ciclo de replicación de los *Orthomyxovirus* ocurre en el núcleo de la célula infectada (Wagner, Hewlett, Bloom, & Camerini, 2007).

1.2. Generalidades del virus Influenza

La influenza es una enfermedad respiratoria causada por los virus de Influenza. Pueden causar enfermedades de moderadas a graves y en ocasiones, incluso la muerte.

1.3. Cuadro clínico

Los síntomas presentados por personas infectadas por el virus de influenza suelen ser: fiebre o la sensación de ésta (no todas las personas infectadas con influenza presentan fiebre), escalofríos, tos, dolor de garganta, flujo y congestión nasal, dolor muscular, dolor de cabeza, fatiga y, en algunas ocasiones, especialmente en niños, se presentan vómito y diarrea (Centers for Disease Control and Prevention, 2016).

1.4. Estructura y composición de la partícula viral

Los virus de influenza se consideran pleomórficos, es decir, tienen una estructura variable. La partícula viral puede ser esférica, en cuyo caso el diámetro será de 80 a 120nm, o filamentosa, con 300nm de longitud. Esto depende del subtipo viral (Wright et al., 2013). Es un virus envuelto que posee una membrana lipídica derivada de la célula hospedera en donde se proyectan las glicoproteínas virales neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA). En la membrana del virus también se encuentra la proteína viral M2 (*Matrix protein 2*) que funciona como canal iónico (figura 1) (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

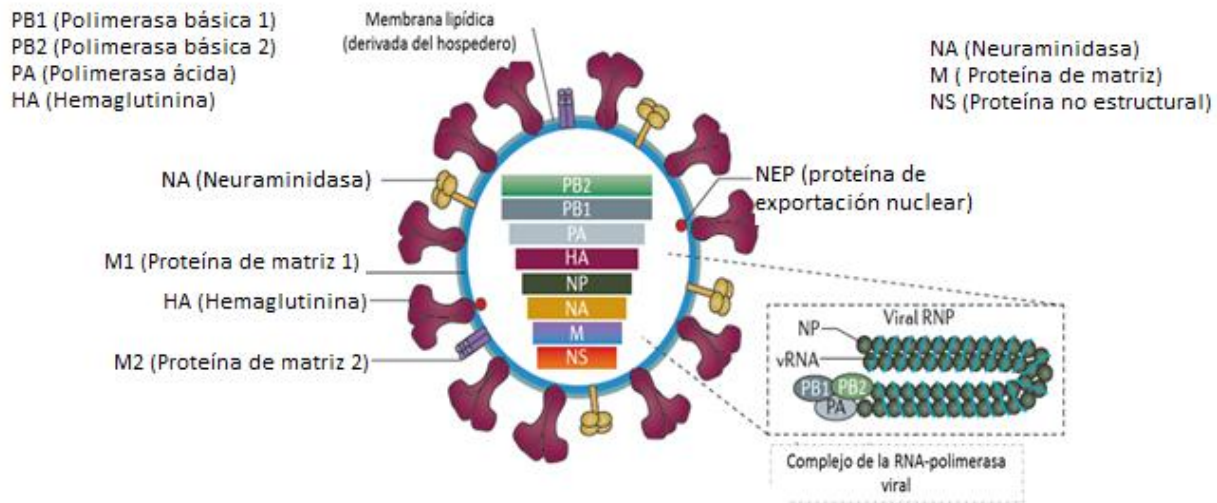


Figura 1 Esquema que ilustra la estructura del virus de influenza. Modificada de Medina y García-Sastre, 2011

La cápside viral está constituida por la proteína M1 (*Matrix protein 1*) que se localiza debajo de la membrana lipídica, formando una estructura helicoidal. En la nucleocápside del virión se encuentran los ocho segmentos del genoma asociados a la RNA-polimerasa viral. Ésta, a su vez, se compone de tres subunidades, PB1 (*Polymerase basic 1*), PB2 (*Polymerase basic 2*) y PA (*Polymerase acid*). Los segmentos del genoma viral se encuentran cubiertos por múltiples unidades de nucleoproteína viral (NP) (Wright et al., 2013). Dentro del virión, cada segmento del genoma viral está asociado a la NP y a la RNA-polimerasa formando el complejo ribonucleoproteína viral (vRNP). La composición bioquímica de cada partícula es de aproximadamente 1% de RNA, 5-8% de carbohidratos, 20% de lípidos y 70% de proteínas (Wright et al., 2013).

1.5. Estructura del genoma viral

El genoma de los virus de influenza tipo A y B se compone de ocho segmentos de RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa. En contraste, los genomas de los virus de Influenza tipo C se componen únicamente de siete segmentos. Algunos segmentos del genoma de influenza tipo A y B codifican para más de una proteína viral. Los virus de influenza utilizan dos estrategias para aumentar la capacidad codificante de su genoma: 1) tienen marcos de lectura abiertos alternativos (ORF) y 2) diversos sitios para “*splicing*” (figura 2). Los segmentos 7 y 8 del genoma de influenza A son procesados por la maquinaria de “*splicing*” celular y dan lugar a cuando menos dos proteínas diferentes; en total el genoma de influenza tipo A codifica para 12 proteínas virales (Shaw & Palese, 2013).

El primer segmento del genoma de Influenza A codifica para la proteína viral PB2, compuesta por 759 aminoácidos (figura 2); es una de las tres subunidades de la RNA-polimerasa viral, y tiene un papel importante en el inicio de la transcripción, ya que se encarga de unir el “*cap*” de los mensajeros celulares a las moléculas de pre-RNA_m virales (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El segundo segmento codifica para la PB1, es uno de los componentes de la RNA-polimerasa viral (figura 2), su función es agregar nucleótidos durante la elongación de la cadena de RNA (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El tercer segmento PA, codifica para el tercer componente de la RNA-polimerasa viral que consta de 716 residuos de aminoácidos y tiene actividad de endonucleasa y/o proteasa durante la transcripción viral (figura 2) (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El cuarto segmento codifica para la proteína HA, que es un trímero que se compone de 550 residuos de aminoácidos. La HA se encuentra en la superficie de la partícula viral en forma de espícula y su principal función es unirse al receptor celular, el ácido siálico (figura 2) (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El quinto segmento codifica para la nucleoproteína viral NP, compuesta de 498 aminoácidos; se une al RNA viral y se encarga de la importación de las ribonucleoproteínas virales hacia el núcleo celular (figura 2) (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El sexto segmento codifica para la proteína NA, es un tetrámero que se compone de 454 residuos de aminoácidos. Al igual que la HA, es un antígeno y tiene actividad enzimática de neuraminidasa; rompe al ácido siálico, evitando así la formación de agregados de partículas virales y de esta manera se liberan los virus de la célula infectada (figura 2) (Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El séptimo segmento del genoma, codifica para la proteína M1, que se compone de 498 residuos de aminoácidos y dentro de sus funciones se encuentran: 1) proteger a las vRNP de agentes externos, 2) participa en la exportación de las ribonucleoproteínas hacia el citoplasma de la célula y 3) recluta a los componentes virales en la membrana del hospedero, sitio donde ocurre el ensamblaje del virión. Este segmento es procesado por *splicing* y da origen a la proteína M2, conformada por 92 aminoácidos, que funciona como canal iónico y también participa en el ensamblaje y formación de la envoltura viral (figura 2) (Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El octavo segmento del genoma viral da origen a dos proteínas virales: la primera es la proteína multifuncional NS1 (No estructural 1), que se compone de 230- aminoácidos

y la segunda es la proteína de exportación nuclear NS2/NEP, constituida por 121 aminoácidos, que modula la exportación de las ribonucleoproteínas virales del núcleo al citoplasma de la célula. La NS1 es la proteína viral encargada de inhibir la respuesta antiviral de la célula infectada por diferentes mecanismos que se describen más adelante, es conocida como la principal antagonista del interferón (IFN) (Medina & García-Sastre, 2011).

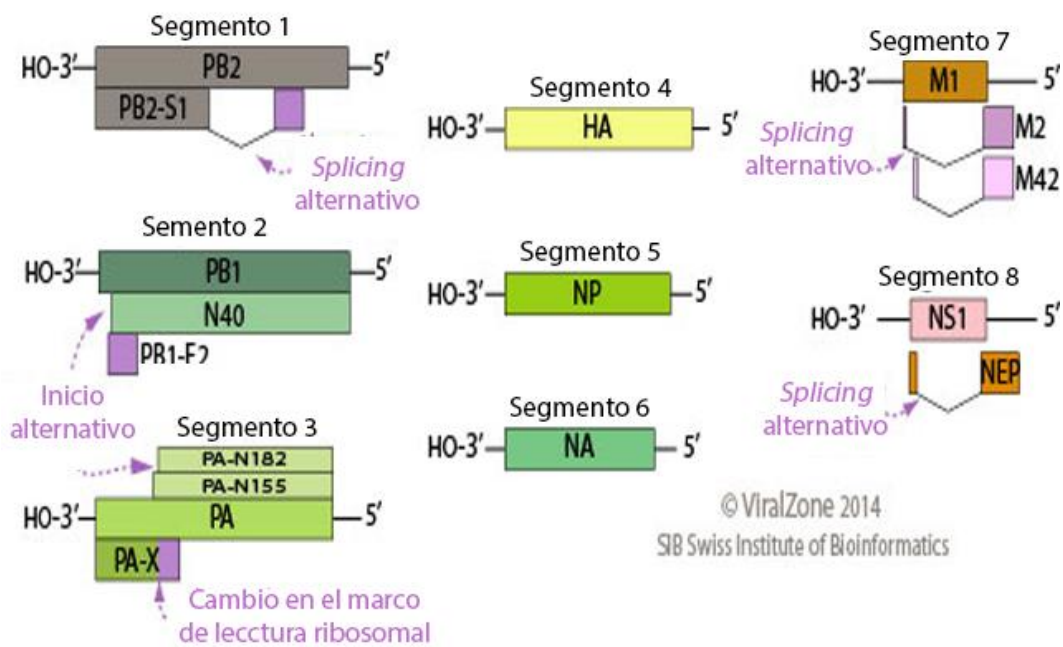


Figura 2 Representación esquemática de la organización del genoma de Influenza virus. Tomado de Viralzone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2014

1.6. Ciclo de replicación viral

La replicación de los virus de influenza ocurre en el núcleo de la célula infectada y se divide en diferentes etapas que se describen a continuación:

1.6.1. Adsorción:

Para iniciar la infección, los virus de Influenza se unen a la superficie celular al reconocer a su receptor que es el ácido siálico (SiA, por sus siglas en inglés). A pesar de que el ácido siálico es una molécula omnipresente, el anclaje del virión se ve restringido por la especificidad de la HA por su tipo de receptor. El SiA en la conformación α -2,6 es abundante en los humanos y el SiA en la conformación α -2,3 en aves. A pesar de esta especificidad, es importante hacer mención de que ambos receptores se pueden encontrar tanto en células humanas como aviares pero en bajas concentraciones (Shaw & Palese, 2013). El receptor del ácido siálico se encuentra en mayor proporción en la superficie de las células epiteliales del aparato respiratorio (Medina & García-Sastre, 2011).

1.6.2. Endocitosis y desencapsidación

Cuando la proteína viral hemaglutinina se une al receptor celular (SiA), la partícula viral es internalizada por endocitosis mediada por clatrina. Posteriormente el endosoma se acidifica por la actividad del canal M2. Una vez acidificado, la HA viral sufre un cambio conformacional que favorece la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma, liberando a las ribonucleoproteínas virales (vRNP, por sus siglas en inglés) en el citoplasma de la célula infectada (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

1.6.3. Translocación de las vRNP hacia el núcleo celular:

Los componentes de la polimerasa viral (PB1, PB2 y PA) y la proteína NP, contienen señales de localización nuclear (NLS), las cuales son reconocidas por la maquinaria de importación celular para el transporte de las vRNPs hacia el núcleo de la célula. La señal NLS de la NP viral interactúa con las importinas α/β de la célula, permitiendo así, el transporte de las vRNPs a través del complejo del poro nuclear hacia el interior del núcleo.

Este proceso ocurre aproximadamente 30 minutos después de la adsorción (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013)

1.6.4. Replicación y transcripción

Una vez que las vRNPs se encuentran en el núcleo celular, la RNA-polimerasa viral (que es dependiente de RNA) lleva a cabo la replicación y transcripción del genoma viral generándose tres tipos de RNA:

- 1) La RNA-polimerasa viral genera RNA mensajero (vmRNA), usando a las vRNPs (3'-5') como templado, los mensajeros virales son poliadenilados. La RNA polimerasa viral corta la Cap en el extremo 5' del pre-mRNA celular, favoreciendo la exportación de los mensajeros virales sobre los celulares.
- 2) La replicación del genoma ocurre a través de un RNA complementario de polaridad positiva (cRNA⁺) (5'-3'), el cual es reconocido por la RNA-polimerasa viral y utilizado como templado para generar los nuevos genomas virales.
- 3) Segmentos pequeños de RNA de polaridad negativa (svRNAs), que funcionan como *switch* y regulan a la RNA-polimerasa viral para que transcriba o replique el genoma viral (Killip, Smith, Jackson, & Randall, 2014; Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013; Wagner et al., 2007; Wright et al., 2013)

1.6.5. Ensamblaje

Las proteínas virales que participan en la transcripción son translocadas al núcleo de la célula y los complejos de ribonucleoproteínas sintetizados *de novo* son exportados al citoplasma para iniciar el ensamblaje de las partículas virales, asistidas por las proteínas de origen viral M1 y NEP. Las proteínas HA, NA y M2 son traducidas en el retículo endoplásmico, en donde se lleva a cabo su plegamiento y son modificadas post-traduccionalmente por glicosilaciones, excepto la M2. Posteriormente, son transportadas por la vía secretora trans-Golgi, y son exportadas hacia las balsas lipídicas de la membrana plasmática, lugar en donde se terminan de ensamblar las partículas virales, asistidas por las proteínas virales M1 (Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

1.6.6. Liberación del virión

En este último paso, la actividad enzimática de la NA es fundamental, ya que corta los residuos de ácido siálico de la membrana de la célula para favorecer la liberación de los nuevos viriones por exocitosis (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

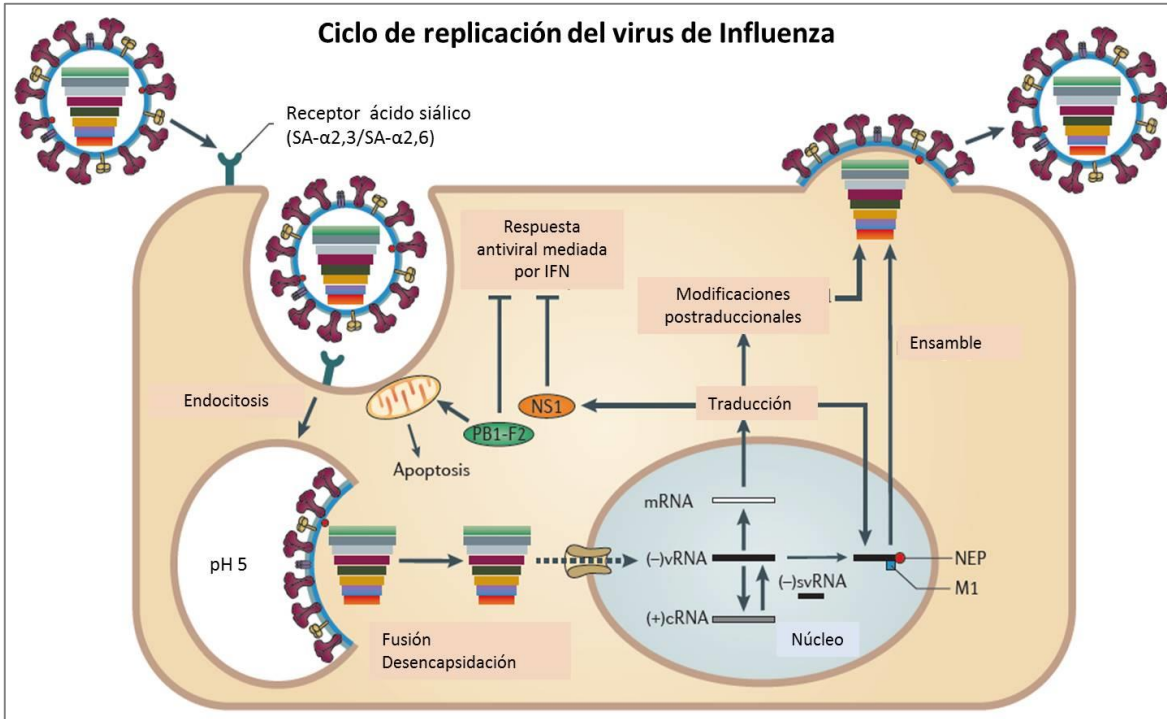


Figura 3 Ciclo de replicación del virus de Influenza. Se muestran los diferentes estadios de la infección viral dentro de la célula hospedera para generar nuevas partículas virales infecciosas. Tomada de Medina y García-Sastre (2008).

1.7. Zoonosis viral

En regiones con climas templados, la influenza estacional ocurre principalmente durante los meses de invierno debido a susceptibilidad física de los virus a la temperatura y humedad. Las epidemias anuales están causadas por cepas circulantes de *Influenza virus A* y *B* generados por deriva antigénica (resultado de mutaciones puntuales espontáneas en los genes de HA y NA, produciendo cambios antigénicos y biológicos en dichas proteínas) y afectan a 3-5 millones de personas en el mundo. En general, los casos leves de infección son superados por los efectos combinados de la respuesta inmune innata. Y aunque la mayor parte de la gente se recupera sin necesidad de consumir antivirales, en grupos de

riesgo una infección mal atendida puede llevar a casos de neumonía, hospitalización, e incluso la muerte. A pesar de los programas de vacunación, al año ocurren entre 250,000 y 500,000 muertes en el mundo (Hale, Albrecht, & García-Sastre, 2010).

La extrema capacidad zoonótica de los virus de influenza A, combinada con la capacidad de los virus segmentados de reacomodar su genoma, a veces lleva a la generación de cepas virales antigénicamente nuevas (salto antigénico) que se pueden replicar eficientemente en humanos y para las cuales hay poca inmunidad presente en la población. Además, para los virus de Influenza tipo A, es posible que surjan reservorios en animales sin hacer un reacomodo de su genoma. Cuando una cepa de este tipo es transmisible de un humano a otro, ser afectado entre un 20 y un 40% de la población mundial en un año (Hale, Albrecht, et al., 2010). La primera pandemia reportada, fue causada por el subtipo H1N1 en el año 1918, conocida como “Influenza española” que provocó alrededor de 50 millones de muertes, siendo la población de adultos jóvenes la más afectada. El segundo reporte de pandemia ocurrió en el año 1957, conocida como “Influenza asiática”, fue producida por el subtipo H2N2. Posteriormente, en el año 1968 un nuevo brote fue causado por el subtipo H3N2 en Hong Kong. Y hacia el año 1977 en Rusia, reemergió el subtipo H1N1. Recientemente, en el año 2009 ocurrió una nueva pandemia causada por una variante de éste subtipo, denominada “Influenza porcina”, siendo México y Estados Unidos (California) el centro de origen, sin embargo, el virus se propagó rápidamente alrededor del mundo, y de acuerdo con la OMS se reportaron más de 18 000 muertos (World Health Organization, 2010)

1.8. Patogénesis

Se ha reportado que la secuencia de aminoácidos de los componentes de la RNA-polimerasa viral (PB1, PB2 y PA), influyen en la patogenicidad del virus. Aunado a esto, la proteína viral NS1 es un componente clave durante la replicación viral puesto que esta proteína interfiere con la respuesta antiviral del hospedero (Medina & García-Sastre, 2011; Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

El virus de la influenza se caracteriza por infectar células epiteliales del aparato respiratorio, aunque también puede infectar a células dendríticas y macrófagos, que resulta en la activación de la respuesta inmune; aunque el virus se puede replicar en todo el aparato

respiratorio, ciertos sitios son óptimos para la generación eficiente de progenie viral infecciosa (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

Durante la infección viral se inducen cambios en todo el aparato respiratorio, sin embargo, estos suelen ser más prominentes en el aparato respiratorio inferior, e incluyen una serie de sintomatologías como: inflamación en laringe, tráquea, bronquios y mucosa nasal, edema, neumonía, trombosis y necrosis, ya que a nivel celular el virus bloquea la síntesis de proteínas e induce la apoptosis. Es importante mencionar que, entre el tercer y quinto día de la infección, se observa una regeneración del tejido, por lo que si llegase a ocurrir daño epitelial se observa después de un mes de la infección (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013).

2. ANTECEDENTES

2.1. Respuesta antiviral de la célula

El tracto respiratorio, sitio en donde ocurre el ciclo de replicación viral, tiene mecanismos no específicos que pueden prevenir la entrada del virión a la célula como: una capa de mucina, movimiento mecánico de cilios e inhibidores de proteasas. Una vez que la partícula viral logra entrar en la célula hospedera, la inmunidad innata es esencial para atacar a la infección viral (Shaw & Palese, 2013; Wright et al., 2013). Cuando los componentes virales se detectan dentro de la célula infectada, se produce una cascada de citosinas que conllevan a la activación y síntesis del factor de interferón tipo I subtipos α/β (IFN-I (α/β)), activando el estado antiviral en la célula para limitar de manera eficiente el ciclo de replicación viral (Killip, Fodor, & Randall, 2015).

2.2. Generalidades del interferón

Los interferones pertenecen a una familia de pequeñas proteínas (19 a 27 kDa) que tienen actividad como citosinas y juegan un papel importante en la respuesta antiviral. También son críticos en la restricción de las etapas tempranas de la infección viral. Los Interferones se clasifican en tres tipos de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y al tipo de receptor al que se unen. Dos de estos tipos están regulados directamente por la infección viral y son los que se secretan principalmente después de la infección por Influenza; estos son IFN tipo I que incluyen varios subtipos pero los relevantes desde una perspectiva

inmunológica son IFN- α e IFN- β ; este tipo de interferón puede ser regulado negativamente por varios mecanismos, incluyendo la internalización y degradación del receptor, defosforilación de las cinasas Janus (JAKs) y transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs), la inducción de supresores de señalizadores de citosinas y la represión de STAT (Killip et al., 2015, 2014; Theofilopoulos, Baccala, Beutler, & Kono, 2005).

El IFN tipo III, que comprende tres tipos de IFN- λ también conocidos como interleucinas IL: 29, 28A y 28B y el IFN- λ 4. El receptor de IFN tipo I está expresado en la superficie de todas las células, mientras que el de IFN tipo III está restringido a células epiteliales del sistema respiratorio y al tracto digestivo. Esto puede ser la causa de que IFN tipo III permita una respuesta antiviral en el epitelio de la vía respiratoria mientras impide la activación de las células del sistema inmune (Egli, Santer, O'Shea, Tyrrell, & Houghton, 2014; Killip et al., 2015; Theofilopoulos et al., 2005). En contraste con IFN-I e IFN-III, IFN-II del que sólo se conoce un subtipo, IFN- γ , es secretado por linfocitos T y células NK (*Natural Killers*) (Killip et al., 2015).

2.3. Activación del factor de transcripción IRF-3 durante la infección viral

Las infecciones virales activan un conjunto de genes celulares que funcionan como defensa celular, entre ellos están los Interferones (IFNs), citosinas y quimosinas, y la activación del sistema inmune. Los mecanismos moleculares por los que los patógenos inducen la expresión de estos genes involucran la activación de proteínas reguladoras de la transcripción como los miembros de la familia NF- κ B y los factores de regulación de IFN (IRFs) (Lin, Heylbroeck, Genin, Pitha, & Hiscott, 1999).

Se conocen 9 diferentes genes de IRF (*IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4/Pip/ICSAT, IRF-5, IRF-6, IRF-7, ICSP/IRF-8 e ISGF3 γ /IRF-9*). Todos estos factores comparten una identidad significativa en 115 aminoácidos en el N-terminal que contiene un sitio de unión a DNA. Se ha demostrado que la función de los IRFs no está limitada a la inducción de IFN tipo I (Paun & Pitha, 2007).

La IRF-3 promueve inmunidad innata antiviral y antibacterial, dado que está involucrado en la activación de los genes IFN- α , IFN- β , IFIT1, CXCL9, CXCL10 y CCL5. El factor de transcripción de interferón 3 (IRF-3) es una proteína de 452 aminoácidos y se expresa constitutivamente en diversos tipos celulares, por lo que existe de manera basal en las células aun cuando no estén infectadas; se ha descrito que presenta secuencias de exportación y localización nuclear (NES y NLS respectivamente). De manera que la IRF-3 se encuentra localizada principalmente en el citoplasma celular (Ysebrant de Lendonck, Martinet, & Goriely, 2014).

El sistema inmune innato es la primera barrera de defensa contra infecciones, causadas por virus o bacterias, a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en inglés PAMPs, que incluyen al DNA y/o RNA viral. Estas moléculas son detectadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), genes antivirales como ROG-I y *Toll-like receptors* (RLRs y TLRs) (Honda & Taniguchi, 2006; Ysebrant de Lendonck et al., 2014)

Las proteínas RIG-I (*Retinoic Acid-Inducible Gene 1*) y MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*) se encuentran en el citoplasma y son los encargados de detectar al RNA viral. Una vez reconocido, se activa el motivo MAVS/Cardif/VISA (también conocido como adaptador IP-S). La proteína MAVS se encuentra en la mitocondria, peroxisomas y membranas asociadas a mitocondrias (MAMs). Una vez que se activa la MAVS ocurre una subsecuente activación de cinasa: IKK ϵ y TBK1; éstas son las encargadas de fosforilar río abajo a la IRF-3 e IRF-7 en residuos de serina (S) y treonina (T) del extremo carboxilo. La fosforilación de IRF-3, provoca la formación de dímeros (IRF3-P), en esta conformación ocurre la translocación de citoplasma hacia el núcleo celular. En este sitio, IRF-3 se asocia con otros factores de transcripción (NF κ B/AP-1 (proteína activadora 1)) y modificadores de la cromatina: la proteína de unión a CREB (CBP) y p300, que promueven la transcripción de sus genes blanco como son el gen IGS e IFN-I (Honda & Taniguchi, 2006; Paun & Pitha, 2007; Ysebrant de Lendonck et al., 2014).

2.4. Generalidades de la proteína no estructural NS1 del virus de la Influenza

2.4.1. Estructura de la proteína viral NS1

El octavo segmento del genoma viral codifica para la proteína no estructural 1 (NS1), la cual está constituida por 230 a 237 residuos de aminoácidos, dependiendo del subtipo viral. La proteína NS1 está compuesta por dos dominios funcionales: el dominio de unión a RNA (RBD) y el dominio efector (ED). El dominio RBD se encuentra en los residuos de aminoácidos 1 a 73. Este dominio a su vez contiene una señal de localización nuclear (NLS1) y el sitio unión a la proteína celular PABPI (*Poly-A binding protein I*) que se encuentra en citoplasma, por lo que se puede unir a diferentes tipos de RNA. Por otra parte, el dominio ED (entre los residuos 73-230) contiene diferentes regiones que permiten interactuar con algunas proteínas del hospedero como el factor específico de corte y poliadenilación CPSF30 (*Cleavage and polyadenylation-specific factor 30-kDa subunit*), la proteína Cinasa-R (PKR), la fosfatidil inositol 3 cinasa (IP3K), PABPII (localizada en núcleo), el factor de inicio de la transcripción en eucariontes 4G1 (eIF4GI) y además, algunos virus pueden tener en este mismo dominio señales de localización nucleolar (NoLS), señales de exportación nuclear (NES) e incluso otra señal de localización nuclear (NLS2) (Abdelwhab, Veits, & Mettenleiter, 2013).

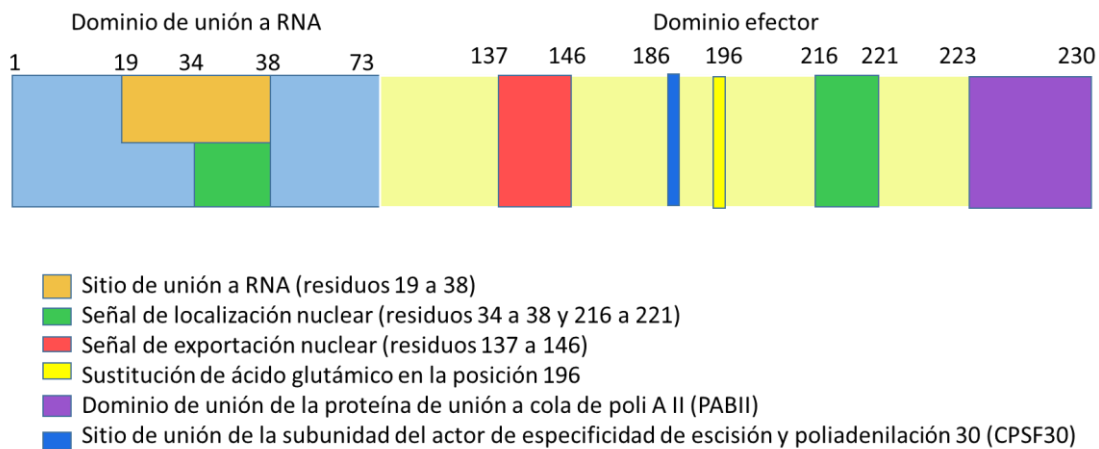


Figura 4 Proteína NS1 en donde se muestran los dominios y el residuo 196 que presenta ácido glutámico

En 2010, Hale y colaboradores encontraron que la proteína NS1 de la cepa de 2009 es incapaz de bloquear por completo la respuesta inmune de la célula hospedera. Las sustituciones presentes en los aminoácidos 103 y 106 (Figura 4), son desestabilizadoras para la unión de NS1 y posterior inhibición de CPSF30 (que interviene en la poliadenilación

de los mensajeros); aunque no esté claro el por qué, estas sustituciones se presentan cuando los virus se adaptan para replicar bien en nuevas especies hospederas, en este caso de porcinos a humanos (Hale, Steel, et al., 2010).

AFO65032.1	1	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTL	50
		. : : . . : :	
ACY77989.1	1	MDSNTMSSFQVDCFLWHIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNTL	50
AFO65032.1	51	GLDIKTATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSR	100
		: . : . : . : : : : : : : : : : : : : : : : :	
ACY77989.1	51	GLDIETATLVGKQIVIEWILKEESSETLRMTIASVPTSRYLSDMTLEEMSR	100
AFO65032.1	101	DWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIMDKNIILKANFSVIFDRLETLLILRAF	150
		. : : : . : : : : : : : : : : : : : : : : :	
ACY77989.1	101	DWIFMLPRQKIIGPLCVRLDQAIMEKNIVLKANFSVIFNRLETLLILRAF	150
AFO65032.1	151	TEEGAIVGEISPLPSLPGHTAEDVKNVAVGVLIGGLEWMDNTVRVSETLQR	200
		: :	
ACY77989.1	151	TEEGAIVGEISPLPSLPGHTYEDVKNVAVGVLIGGLEWNGNTRVSENIQR	200
AFO65032.1	201	FAWRSSNENGRPPLTPKQKREMAGTIRSEV	230
		: . : . :	
ACY77989.1	201	FAWRNCDENGRPSLPPEQK-----	219

Figura 5 Alineamiento de las secuencias primarias de la proteína NS1 de la cepa estacional (A/New Caledonia/20/99) (AFO65032.1) y la cepa pandémica (A/Mexico/09) (ACY77989.1) que muestra presencia de residuo de ácido glutámico (E) en la posición 196. Dicho residuo está relacionado con la inhibición de interferón. Secuencias tomadas de Pubmed y alineadas con EMBOSS Needle

2.4.2. Funciones de la NS1

La proteína no-estructural (NS1) de la Influenza tipo A, es un factor de virulencia con múltiples funciones accesorias (Hale, Randall, Ortin, & Jackson, 2008). Durante el ciclo de replicación viral ocurren múltiples interacciones de la NS1 con proteínas virales y celulares (Abdelwhab et al., 2013).

La NS1 es conocida como el antagonista del IFN, se sabe que evita la activación de la transcripción del gen de *ifn* en la célula hospedera, inhibiendo así, la respuesta antiviral de la célula infectada. Esta proteína también participa en otras vías antagonistas a la respuesta inmune. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales la NS1 inhibe en múltiples sitios la vía de señalización del IFN, así como de proteínas inducidas por estas (Hale et al., 2008; Na et al., 2016). Se ha reportado, que el dominio ED ubicado en el extremo carboxilo de la NS1 es una región que varía entre las diferentes cepas del virus de influenza. Estas diferencias se reflejan en el mecanismo que media la

NS1 para bloquear la producción del IFN y en consecuencia inhibir la respuesta antiviral (Krug, 2015). Por un lado, la NS1 bloquea la activación de los factores de transcripción del gen de IFN como IRF-3 y NFκB y en consecuencia inactiva su función de factor transcripcional para el gen de IFN (IFN-β). Sin embargo, este mecanismo de inhibición por parte de la NS1 no se lleva a cabo en todos los subtipos de influenza tipo A, ya que cada cepa puede presentar diferencias en la secuencia del dominio ED y en consecuencia existen diferencias funcionales (Kuo, Zhao, Malur, & Krug, 2010). La NS1 de cepas aviares (H5N1/H9N2) bloquea a los factores de transcripción para el gen de IFN (IFN-β) como NFκB, AP-1 e IRF-3. Por otra parte, de los virus que infectan a humanos, la NS1 de solo algunas cepas estacionales del subtipo H1N1, así como, la NS1 del virus pandémico (2009), inhiben la activación del IFN a través de IRF-3 y NFκB; sin embargo, la NS1 de los subtipos H3N2 y H2N2 u otros virus estacionales H1N1, no lleva a cabo este mecanismo. Esta diferencia funcional se atribuye a un cambio en la posición 196 de la cadena peptídica (dominio ED) (figura 4). Las NS1 que bloquean a IRF-3 y NFκB tienen un residuo de ácido glutámico (E) en esa posición. En contraste, la NS1 de las cepas que no bloquean la activación del IFN a través de este mecanismo tienen lisina (Krug, 2015; Kuo et al., 2010)

La NS1, a través de su dominio RBD, es capaz de unirse a RNA. de doble cadena para bloquear la transcripción de genes antivirales u otros sensores antivirales como PKR (proteína cinasa R) y OAS (2'-5'-oli-goadenilato sintetasa (2'-5'-OAS); ambos son reguladores de la transcripción y traducción de genes antivirales, como RIG-I. La NS1 interacciona con otras proteínas como: CPSF30 y PABII, ambas proteínas participan en la maduración de varios tipos de mRNA celular, incluyendo el mRNA del IFN, en la unión de la *cap* y la cadena de poliA, ésta interacción impide la maduración de los mRNA celulares y por ende bloquea su exportación hacia el citoplasma y, en su lugar, promueve la unión del cap y la poliadenilación del mRNA viral, favoreciendo la exportación de los mensajeros virales (Abdelwhab et al., 2013). La inhibición del procesamiento del pre-mRNA del IFN se lleva a cabo a través de la unión del dominio ED con la proteína celular CPSF30, y es modulado por la NS1 de los subtipos H3N2 y H2N2, los cuales no inhiben la activación de IRF-3. Se ha reportado que la NS1 del subtipo H1N1 pandémico, no se une a esta subunidad debido a que su secuencia carece de tres residuos de aminoácidos que se requieren para la interacción. Sin embargo, al restaurar el sitio de unión a CPSF30 se incrementa la replicación del virus (Hale et al., 2008).

Las proteínas NS1 provenientes de cepas aisladas en humanos, se clasifican en dos categorías de acuerdo al mecanismo empleado para la inhibición del IFN (Krug, 2015):

- 1) Las NS1 que bloquean la activación de IRF-3 evitando la activación de la transcripción del gen *ifn*.
- 2) O bien, inhibiendo el procesamiento del pre-mRNA de IFN a través de la unión con CPSF30, como los subtipos H3N2, H2N2 y algunas cepas del subtipo H1N1, después del 2009.

2.4.3. Modificaciones post-traduccionales de NS1

Las modificaciones post-traduccionales son un mecanismo común en las proteínas multifuncionales. Dada la cantidad de funciones realizadas por la NS1, se han hecho varios estudios para conocer las modificaciones de la NS1. Hasta la fecha, se ha descrito que es modificada por fosforilación, así como por dos proteínas de acoplamiento similares a la ubiquitina, ISG15 (Interferon Simulated Gene 15) y SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) (Ayllon & Garcia-Sastre, 2015).

Algunos estudios han demostrado que la proteína NS1 puede ser fosforilada probablemente en el núcleo después de un corto tiempo post-infección. Análisis estructurales sugieren diferentes residuos de serina y treonina para la fosforilación, siendo después identificados como T215, S42 y S48 (Hale et al., 2008; Krug, 2015).

A pesar de que se ha visto que NS1 es ISGilada en diferentes lisinas, se ha encontrado una preferencia por K41, que está relacionada con la unión e importación nuclear del dsRNA. La modificación de K41 por ISG15 altera la interacción de NS1 con la carioferina sin alterar sus propiedades de unión a dsRNA. La sustitución de K41 surte el mismo efecto protector sobre la cinética de crecimiento viral contra el tratamiento de interferón como siRNA *knock-down* de ISG15 (Ayllon & Garcia-Sastre, 2015).

Otra proteína similar a ubiquitina que puede ser conjugada con NS1 es SUMO. Las proteínas SUMO pueden regular función, estabilidad, ubicación e interacciones con numerosas proteínas, tanto celulares como de diferentes patógenos, entre ellos los virus. NS1 puede ser modificada por los tres isotipos principales de SUMO (SUMO1 y SUMO2/3) (Everett & Chelbi-Alix, 2007; Andrés Santos, Chacón, & Rosas-acosta, 2013).

La SUMOilación de NS1 es cepa-dependiente, y hasta el momento no se ha detectado en la cepa pandémica de 2009. El papel de SUMO sobre NS1 no se ha aclarado completamente aunque en algunas cepas podría afectar la estabilidad de la proteína (Ayllon & Garcia-Sastre, 2015).

2.5. Generalidades de los cuerpos PML (PML-NBs) y la maquinaria de SUMOilación celular

Los cuerpos PML (NBs), también llamados ND10 (*Nuclear Dot 10*), son esferas de 0.1 a 1.0µm encontradas en la mayoría de las líneas celulares y en muchos tejidos. Dependiendo de tipo celular, se pueden encontrar de 2 a 30 PMLs en una célula. Pertenecen a la matriz nuclear, una superestructura del núcleo que se ha propuesto sirve para anclar y regular diferentes funciones nucleares, incluyendo la replicación y la transcripción del DNA, así como el silenciamiento epigenético. Por tanto, los PML están involucrados en la reparación de DNA, oncogénesis, respuesta celular a estrés, apoptosis, ciclo celular, señalización hormonal, regulación en la transcripción y respuesta antiviral. Se sabe que en los PML-NBs se encuentra la maquinaria de SUMOilación celular. Se ha descrito que en la infección viral ocurre una reorganización de estas subestructuras nucleares por medio de la SUMOilación celular y la deSUMOilación de algunos elementos de los PML-NBs (Everett & Chelbi-Alix, 2007; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2009; Maroui, El Asmi, Dutrieux, Chelbi-Alix, & Nisole, 2014).

2.5.1. Sistema de SUMOilación celular

La SUMOilación es una modificación post-traducciona que consiste en la conjugación de miembros de la familia SUMO (*Small Ubiquitine-like Modifier*) en residuos de lisina de la proteína blanco. Hasta la fecha se han descrito cuatro parálogos de SUMO

en mamíferos: SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 y SUMO-4. La SUMO-1 es un oligopeptido de 11-12 kDa y únicamente comparte el 50% de similitud con SUMO-2 Y SUMO-3, por su parte éstas dos proteínas difieren entre sí sólo en tres residuos en el extremo amino terminal, por lo que comúnmente se hace referencia como SUMO-2/3; ésta proteína tiende a formar polímeros o cadenas en la proteína blanco y, por el contrario, la SUMO-1 funciona como terminador. La proteína SUMO-4, se detectó en condiciones de estrés celular extremo y se propuso con base a análisis de secuencias de DNA, en donde se observó que comparte el 87% de similitud con SUMO-2; sin embargo, podría ser un pseudogen puesto que carece de intrones, además, no se detectó de manera endógena (Wilkinson & Henley, 2010).

Las proteínas SUMO se unen covalentemente a otras proteínas. Esta interacción produce un cambio en la función, estabilidad o cambio de localización intracelular de las proteínas blanco, o bien, puede promover la interacción con otras proteínas. Por lo tanto, el sistema de SUMOilación está involucrado en la regulación de múltiples mecanismos celulares como regulación de la transcripción, reparación de DNA , formación y maduración de los PML-NBs (Everett, Boutell, & Hale, 2013; Everett & Chelbi-Alix, 2007).

2.5.2. Mecanismo de SUMOilación celular

El sistema de SUMOilación se lleva a cabo en el núcleo celular. A continuación, se describen los eventos necesarios para que pueda ocurrir esta modificación post-traducciona l en la proteína blanco (Everett et al., 2013; Wilkinson & Henley, 2010):

- a) La proteína SUMO es un precursor inactivo, por lo tanto, previamente debe ser procesada a su forma activa. Esto es llevado a cabo por acción específica de las proteasas específicas para SUMO (SENPs). Estas cortan en el motivo Gly-Gly del extremo carboxilo de la SUMO.
- b) Posteriormente, en un residuo de Cys en el extremo carboxilo de SUMO se une el heterodímero E1 (conformado por las proteínas SAE1-SAE2) a través de un enlace tioéster, dependiente de ATP.
- c) Una vez ocurrido esto, la proteína SUMO se encuentra en su forma activa, y en este estado, la proteína E2, también denominada Ubc9, es capaz de unirse a SUMO en residuos de Cys.

- d) La proteína Ubc9 por sí sola puede unirse en residuos de Lys a la proteína blanco, sin embargo, la unión de Ubc9 con E3 le da especificidad por el sustrato, además, éste en su mayoría tienen un motivo consenso: Ψ -Lys-Xaa-Asp/Glu (Ψ : aminoácido hidrofóbico/ Xaa: cualquier aminoácido).
- e) La SUMOilación es un proceso dinámico y reversible, y las enzimas SENPs son encargadas de modularlo de manera que las SENPs cortan a la SUMO del sustrato, este proceso se conoce como desconjugación. Una vez que la proteína SUMO se libera puede ser reintegrada al ciclo (Everett et al., 2013; Wilkinson & Henley, 2010).

2.6. Diálogo molecular entre los componentes del virus de la influenza y el sistema de SUMOilación celular.

En estudios anteriores, se ha demostrado que en la infección por Influenza, contrario a lo que sucede en otros microorganismos, se produce un incremento global en la actividad del sistema de SUMOilación celular, suponiendo una mejora en la replicación del virus (Andrés Santos et al., 2013). También se ha reportado que las proteínas virales NS1, M1, NP, PB1 y PB2, son modificadas por SUMOilación en la infección viral (Pal, Santos, Rosas, Ortiz-Guzman, & Rosas-Acosta, 2011). La proteína M1 es SUMOilada en la K42, y para ocurra este proceso se requiere que las vRNP puedan exportarse al citoplasma. Las vRNPs junto con las M1 se transportan al citoplasma en el complejo vRNP-M1, interacción que determina la morfología del virus. En los ensayos realizados por Wu en 2011, se demostró que los virus silvestres liberaban partículas en forma esférica, mientras que los virus mutantes, que carecían de sitio de unión a SUMO, originaban partículas virales en forma alargada y que además tenían una menor progenie viral (Wu, Jeng, & M-C Lai, 2011).

En otro estudio se reportó que la proteína NS1 de de la influenza aviar H5N1 es modificada por SUMO1 e interacciona con un componente de la maquinaria de SUMOilación, Ubc9. Al NS1 estar SUMOilada aumentó su estabilidad y como consecuencia hubo un aumento en la replicación viral. Se demostró que esta SUMOilación es una modificación conservada en cepas aviares y humanas (H2N3 y H1N1 respectivamente) para las lisinas K219/K221 y en otras K219/K217, a excepción de la H1N1 pandémico de 2009, que tiene ausencia de 11 residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo, en donde se encuentra el sitio de unión a SUMO1 K219 (Xu et al., 2011).

En un estudio realizado por Santos en 2013 con la cepa de Influenza Humana PR8 (A/Puerto Rico/8/1934), se demostró que NS1 interacciona con SUMO1 y SUMO2/3, con sitios de unión en las lisinas K70/K219. Se demostró que la SUMOilación de NS1 es necesaria para que ésta tenga una actividad antagonista de IFN. También se demostró que esta forma de NS1 está relacionada con la cantidad de dímeros y trímeros de ésta durante la infección viral, que es relevante pues se requiere de la dimerización de NS1 para su unión a RNA y así bloquear la respuesta de IFN; por otro lado, esta configuración de NS1 puede interactuar con otras proteínas de la célula (Andrés Santos et al., 2013).

La proteína viral NP es SUMOilada en especial por SUMO1 en K7/K4 localizadas en el extremo N-terminal. La SUMOilación de la NP en la K7 es vital para la replicación del virus. El tráfico intracelular de la NP se incrementa cuando está SUMOilada (Han et al., 2014).

2.7. Fosforilación y SUMOilación de IRF-3 durante la infección

Los virus de Influenza interactúan ampliamente con el sistema de SUMOilación celular durante el ciclo de replicación viral. Una de las estrategias para atacar a la respuesta antiviral de la célula es a través de la interacción de la NS1 con SUMO (Andrés Santos et al., 2013; Xu et al., 2011), ya que se ha demostrado que la NS1 inhibe la activación de los factores de transcripción del gen de IFN como IRF-3 y NFκB. Sin embargo, se desconoce a detalle el mecanismo molecular por el cual la NS1 modula la respuesta del IFN-I en los diferentes subtipos de influenza (Krug, 2015)

En nuestro laboratorio se ha demostrado que en células infectadas con el virus de influenza estacional la proteína IRF-3 es fosforilada (forma activa) y relocalizada hacia el núcleo celular, en donde colocaliza con SUMO-1 (Figuras 5 y 6, respectivamente). En contraste, en la infección con la cepa pandémica, la IRF-3 se encontró de manera difusa en el núcleo y citoplasma de la célula infectada (esto indica que la activación de la IRF3 es menor comparada con la cepa estacional). En la infección por el virus de influenza estacional, la IRF-3 es modificada por la unión de SUMO-1 (López-Tercero, 2015). Estos

resultados indican que en la infección con la cepa estacional versus la cepa pandémica, existen diferentes mecanismos para inhibir la activación de la IRF3 y por lo tanto de modular la expresión del gen *ifn*.

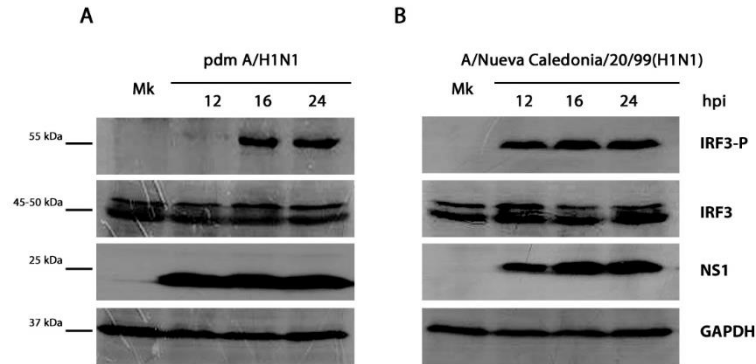


Figura 6 Inmunodetección de las proteínas celulares IRF-3, p-IRF-3, GAPDH como control de carga y de la proteína viral NS1, como control de infección. Extractos totales de células A549 fueron preparados y sujetos a análisis por SDS-PAGE, posteriormente fueron transferidos a PVDF e incubados con los anticuerpos dirigidos a las proteínas (Tomada de la tesis de López-Tercero Andrea, 2016)

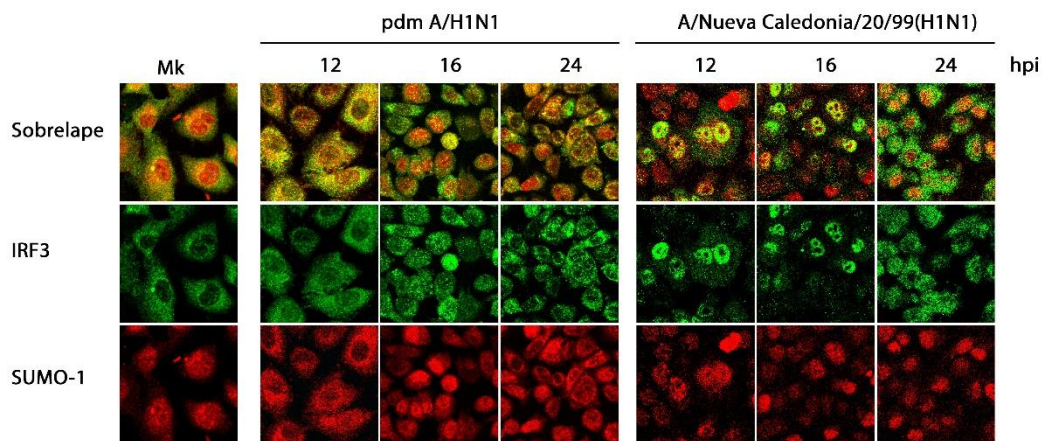


Figura 7 Distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3 (verde) y SUMO-1 (rojo), en células A549 infectadas con el virus de Influenza H1N1 estacional (A/New Caledonia/20/99) y pandémico (A/Mexico/09), a una MOI= 5 PFU/cel, respectivamente (Tomada de la tesis de López-Tercero, Andrea)

3. HIPÓTESIS

La proteína viral NS1 de la cepa estacional vs la pandémica de influenza H1N1/A, regula de manera diferencial al factor de transcripción IRF-3 favoreciendo su SUMOilación y de esta manera se inhibe la expresión del gen *ifn* tipo I, favoreciendo la multiplicación viral.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el estado de activación de la IRF-3 (SUMOilación y fosforilación) en la infección con la cepa estacional y pandémica, a lo largo del ciclo de replicación viral.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar el estado de activación de IRF-3 (SUMOilación y fosforilación) a partir de las fracciones nuclear y citoplásmica de células infectadas con el virus de influenza estacional y pandémico, a diferentes tiempos del ciclo de replicación viral.
- Cuantificar la expresión del gen *ifn* tipo I en células infectadas con influenza H1N1/A (estacional y pandémica) a diferentes tiempos del ciclo de replicación viral mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Células y virus

Para la amplificación y titulación de virus de Influenza estacional (H1N1/A/New Caledonia/99) y pandémica (H1N1/A/México/09) se utilizaron células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*). Ambas cepas se propagaron con una MOI (Multiplicidad de infección) inicial de 0.01 PFU/cel (unidades formadoras de placa). La adsorción viral se realizó durante 2h a 37°C con 1.2µg/mL de tripsina (*In vitro*). El inóculo se desechó y se agregó medio DMEM suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB) (*Biowest*).

Para la cuantificación de partículas virales se utilizó la Técnica de Ensayo en Placa de la siguiente manera: se infectó una monocapa de células MDCK con diluciones seriadas

del virus. La adsorción se realizó durante 2h, y después se agregó medio suplementado con agar (*BD Difco™*). Se dejó a 37°C y después de 72h se removió el agar para teñir durante 24h la monocapa con cristal violeta al 20% de etanol a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con agua corriente. Se cuantificaron las placas líticas a fin de obtener el título viral. El cálculo para obtener las PFUs fue el siguiente:

$$(No. de placas formadas)(1 \times 10^x)(Factor de dilución)(\mu L de virus utilizado)$$

Para todos los otros ensayos realizados, se utilizaron células A549 (*Human lung adenocarcinoma epithelial cell line*), las cuales fueron infectadas y cosechadas a las 12, 16 y 24 horas post-infección (hpi).

Ambas líneas celulares se crecieron a 37°C con 5% de CO₂ en medio DMEM 1x (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*) (*Gibco/BRL*), suplementado al 10% con SFB (*Biowest*), adicionado con 1% de penicilina-estreptomina (*Invitro*).

5.2. Extracción y purificación de proteínas totales

A partir de los cálculos realizados para obtener las PFU, las células se infectaron utilizando una MOI de 5 PFU por célula y se cosecharon a las 12, 16 y 24hpi. Estas células se centrifugaron a 12 000rpm durante 5 minutos, desechando el sobrenadante y lavando la pastilla con PBS 1X estéril (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, y 1.8mM K₃PO₄); la pastilla se resuspendió en 200μL de buffer de lisis RIPA (150mM NaCl; 50mM Tris pH8; 0.1% SDS (dodecilsulfato de sodio); 0.5% Deoxicolato de sodio; 5mM EDTA pH 7.5; NP40 1%; inhibidor de proteasas 1x (*Complete*)), se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, el homegenizado se centrifugó a 13000rpm durante 5 minutos a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteínas totales usando un reactivo semejante al método de Lowry (*Bio-Rad DC proteín Assay*). La concentración de proteínas se ajustó a 20μg partiendo de una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA 1-5μg/mL, *Sigma*).

5.3. Fraccionamiento celular

Las células cosechadas a 12, 16 y 24hpi se resuspendieron en un buffer frío de lisis citoplasmática (50mM Tris HCl a pH de 7.5; 100mM NaCl; 2mM EDTA; 0.5% igepal; 25mM

iodacetamida; 25 mM N-ethylmaleimide y EDTA completo inhibidor de proteasas), se incubó durante 10 minutos en hielo y luego se centrifugó a 3000rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente se separó el sobrenadante, que contenía la fracción citoplásmica. La pastilla se lavó dos veces y se resuspendió en un buffer de lisis para núcleo (25mM Tris-HCl, a pH 8.0; 50mM NaCl; 0.5% deoxicolato de sodio; 1% triton X-100; 0.1% SDS; 25mM iodacetamida; 25mM N-etilmaleimida; y un coctel inhibidor de proteasas) y se incubaron en hielo durante 30 minutos; después del tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 13,000rpm durante 5 minutos a 4°C, y se recolectó el sobrenadante, que contenía la fracción nuclear.

5.4. Inmunodetección de proteínas por SDS-PAGE y Western-blot

Para estudiar las proteínas obtenidas a partir del fraccionamiento celular se corrieron en geles de poliacrilamida (*BioRad*) al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (*Polyvinilidene fluoride; Milipore*) por electroforesis en cámara semi seca (*Trans-Blot SD Semy-dry Transfer cell, BioRad*) con los buffers ánodo (60mM Tris-base, 20% metanol. pH 10.4) y cátodo (5mM Tris-base, 8mM glicina, 20% metanol pH 9.4) a 120 miliamperios por 2 horas. Cada membrana se bloqueó con 0.5% de BSA durante 2h en movimiento a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos cada ocasión con solución de lavado TBS-T 1x-0.1% (50mM Tris-HCl a pH de 7.6; 150mM NaCl). Posteriormente, se hizo una incubación *overnight* a 4°C con anticuerpo primario diluido en TBS-BSA 0.5 Tween 0.1%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-NS1 policlonal (1-3000, *Gene Tex*), anti-IRF-3 total, anti-p-IRF-3 (4D4G) (*Cell Signaling*), anti-GAPDH policlonal (1:1000, *Santa Cruz Biotechnology*) anti- β -tubulina y anti-H3. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa correspondiente: anti-IgG de ratón y conejo (1:1000, *Jackson Immuno Research*) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados y se reveló usando sustrato quimioluminiscente ECL (*Invitrogen*) como lo describe el fabricante. La membrana se expuso a películas autorradiográficas.

5.5. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

A partir de células cosechadas a las 12, 16 y 24hpi, se obtuvo el RNA total con el AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep kit (*Axygen Scientific*) siguiendo las instrucciones del fabricante y en condiciones de esterilidad.

Para la síntesis de cDNA se cuantificó el RNA extraído con un Nanodrop 2000 (*ThermoFisher Scientific*) y se hicieron los cálculos pertinentes para tomar 2µg de RNA total. En tubos de 500µL para microcentrífuga se agregaron 1µL de oligo dT, 1µL de dNTPs 10x, y la cantidad correspondiente de RNA; se llevó a un volumen total de 12µL. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos, terminado ese tiempo se pasó inmediatamente a hielo, se les dio un *spin* y se añadieron 4µL de buffer *First-Stram 5x* y 2µL de DTT 0.1M, se mezcló suavemente y se incubó a 42° por 2 minutos. Pasado ese tiempo se agregó la enzima SUPERSRIPT II, se mezcló con la pipeta y se dejó incubar a 42°C durante por 50 minutos. La reacción se inactivó en incubación a 70°C por 15 minutos.

5.6. RT-PCR en tiempo real (Taqman)

Para cuantificar la expresión del gen de IFN en la infección con la cepa estacional y pandémica, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real, utilizando *primer's* y sondas específicas para cuantificar IFN-B y GAPDH (*Applied biosystems*).

Primero se realizó una curva de rango dinámico para la que se hicieron diluciones de la muestra que posiblemente tenía más mensajero de IFN a analizar. En este caso se tomó el cDNA de 12hpi. A partir de esta curva se obtuvo cuál era la dilución con la que se obtenían mejores resultados, para este ensayo se tomó la segunda dilución.

Para la detección del mensajero de IFN, siempre bajo condiciones de esterilidad, se tomaron 32µL de H₂O DEPC (100mL de agua destilada; 0.01% de DEPC) y 8µL de cDNA de cada muestra (12E, 16E, 24E, 12P, 16P y 24P), se mezcló bien y de esta dilución, se tomaron 8µL que fueron agregados en 32µL de H₂O DEPC. Dichas diluciones se mantuvieron en hielo.

Para realizar la mezcla, se tomaron en cuenta 23 reacciones (6 muestras más un blanco con sus triplicados, más un excedente) para cada gen.

Reactivo	1 reacción	23 reacciones
Master Mix	10µL	230µL
Sonda Taqman (IFN/GAPDH)	01µL	023µL
H ₂ O DEPC	04µL	092µL
cDNA*	05µL	N/A

Se resuspendió bien cuidando no hacer burbujas. Posteriormente, la mezcla se dividió en 7 tubos de 500µL para microcentrífuga previamente rotulados (12E, 16E, 24E, 12P, 16P o 24P). Para cada tubo se tomaron 48µL de la mezcla y luego se le añadieron 15µL de la dilución 2 del cDNA correspondiente. Se mezcló suavemente.

En una placa para RT-PCR se agregaron 19µL por pozo de la manera siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	12E	12E	12E	16E	16E	16E	24E	24E	24E	12P	12P	12P
B	16P	16P	16P	24P	24P	24P	NTC	NTC	NTC			
C	12E	12E	12E	16E	16E	16E	24E	24E	24E	12P	12P	12P
D	16P	16P	16P	24P	24P	24P	NTC	NTC	NTC			
E												
F												
G												
H												

GAPDH

IFN

La placa se cerró herméticamente con una mica especial y se centrifugó a 4°C por 5 minutos a 1000rpm. Se llevó al termociclador. El análisis de datos se realizó de acuerdo al método comparativo Ct (Δ Ct) descrito por el fabricante (Applied Biosystems). La cantidad relativa de la cantidad de mRNA de cada gen se obtuvo por la normalización de la cantidad del mRNA GAPDH celular, como control endógeno.

6. RESULTADOS

6.1. El factor de transcripción IRF-3 es modificado diferencialmente por la unión de SUMO1 durante la infección por influenza H1N1 estacional y pandémica

Con el objetivo de determinar si la IRF-3 es modificada por la unión de SUMO-1 en la infección por el virus de Influenza H1N1 y en qué compartimento celular ocurre dicha modificación post-traducciona se realizaron experimentos de inmunoprecipitación y Western Blot como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Se obtuvieron fracciones nucleares y citoplásmicas, a partir de células A549 infectadas con la cepa estacional y pandémica, a diferentes tiempos de infección (hpi) (Figura 7A). Estas fracciones celulares se cosecharon a las 12, 16 y 24 hpi, se inmunoprecipitaron utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IRF-3 unido a perlas de agarosa. Posteriormente, se determinó la unión de SUMO-1 a la IRF-3 mediante ensayos de Western Blot, utilizando un anticuerpo específico para detectar SUMO-1 (Figura 7A). En las células no infectadas en la fracción citoplásmica se observó una banda de 80kDa y en la fracción nuclear una banda de 90kDa, sugiriendo que la IRF-3 se presenta niveles basales de modificación por SUMO-1 (asterisco en Figura 7A, izquierda).

En la infección con la cepa pandémica, a las 12 hpi se observó un ligero incremento en el nivel de IRF-3/SUMO-1, en ambas fracciones, citoplásmica y nuclear (Fig. 7A). A las 16 hpi, en la fracción nuclear se observó un incremento considerable en la banda que corresponde a la IRF-3-SUMO-1. De manera interesante, a las 24 hpi, la mayor cantidad de IRF-3 modificado por SUMO-1 fue detectado en la fracción citoplásmica. En contraste, en las células infectadas con la cepa estacional a las 12 hpi, sólo en la fracción nuclear se presentó una ligera banda de IRF-3-SUMO-1 (Figura 7A). La abundancia de la banda nuclear incrementó significativamente a las 16 hpi. Y en contraste con células infectadas

con la cepa pandémica, a las 24hpi, se presentó una clara reducción en los niveles de IRF-3-SUMO-1 en ambas fracciones celulares (Figura 7A). Estos resultados claramente muestran que IRF-3 es modificada diferencialmente por la unión SUMO-1 durante la infección con la cepa pandémica y estacional. Los niveles de IRF-3-SUMO-1 fueron significativamente más elevados en la infección con la cepa pandémica respecto a la infección con la cepa estacional. Sugiriendo una regulación diferencial de la IRF-3 por la unión de SUMO-1, en el citoplasma y/o en el núcleo de la célula infectada que depende de la cepa viral y del tiempo de infección.

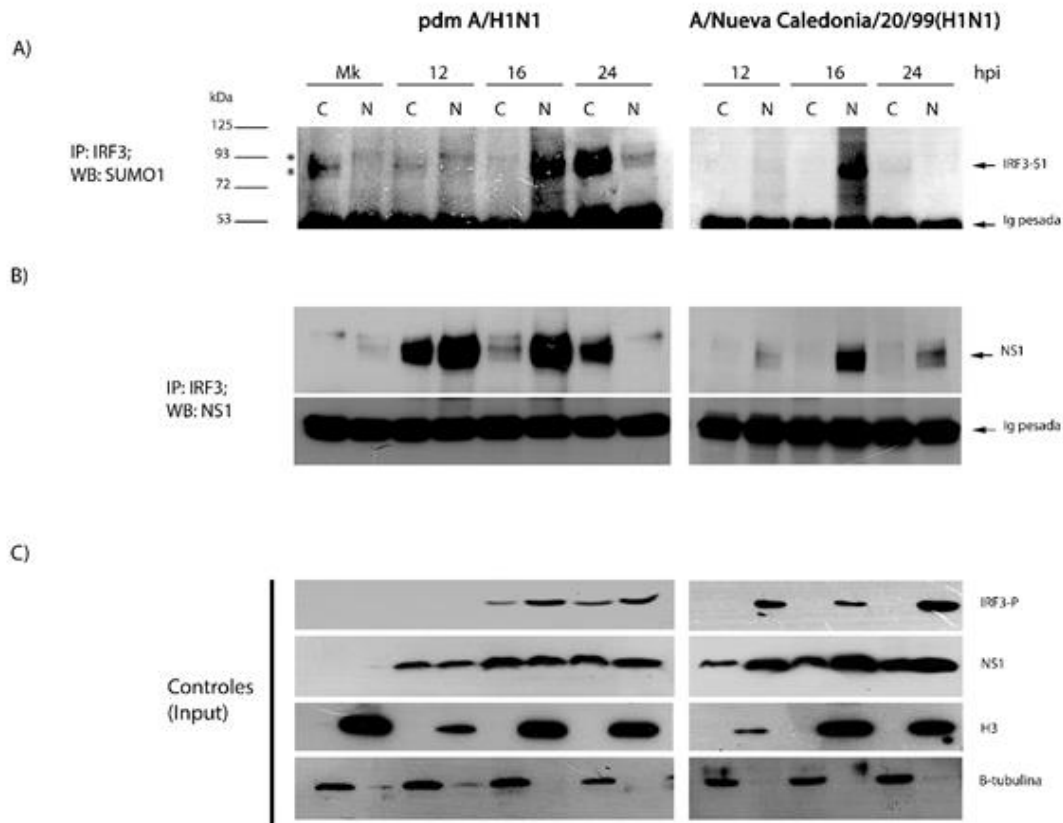


Figura 8 Modificación de la proteína IRF-3 por la unión de SUMO-1 durante la infección por influenza H1N1 pandémica o estacional: **A)** Las células A549 fueron no infectadas (mk) o infectadas con la cepa pandémica o estacional. Se obtuvieron proteínas a partir de fracciones nucleares (N) y citoplásmicas (C), a las 12, 16 y 24hpi y se analizaron por ensayos de inmunoprecipitación y Western Blot. La inmunoprecipitación de la IRF-3 se realizó utilizando el anti-IRF-3, posteriormente se corrieron las muestras en geles SDS-PAGE al 10% y se observaron mediante inmunodetección utilizando los anticuerpos anti-SUMO-1 o el anti-IRF-3 (como control). Las bandas específicas de IRF-3-SUMO-1 se indican por (*). **B)** A partir de las muestras nucleares y citoplásmicas se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y Western Blot. La co-inmunoprecipitación de la IRF-3 se realizó utilizando el anti-IRF-3, y se resolvió en geles de SDS-PAGE al 10%, posteriormente se observaron por inmunodetección utilizando los anticuerpos anti-NS1. **C)** Los ensayos de Western Blot se realizaron utilizando el anti-p-IRF-3 (control activación de la IRF-3), anti-NS1 (control de infección) y como control del fraccionamiento anti-H3 (Histona 3, marcador nuclear) y anti-B-tubulina como marcador de la fracción citoplásmica.

6.2. La proteína viral NS1 interacciona con IRF-3 en diferentes compartimientos celulares

Para determinar la interacción de la proteína viral NS1 con la IRF-3, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando fracciones nucleares y citoplásmicas de células infectadas con la cepa estacional o pandémica, a diferentes tiempos post-infección (12, 16 y 24 hpi). Se utilizó el anticuerpo anti-IRF3 para realizar la co-inmunoprecipitación

y posteriormente se realizaron ensayos de Western Blot contra NS1 (figura 7B). Como se muestra en la figura, la proteína NS1 de la cepa estacional interactúa con la IRF-3 principalmente en el núcleo de las células infectadas a las 12, 16 y 24 hpi; encontrándose una mayor interacción (NS1-IRF3) a las 16 hpi en la fracción nuclear. También se determinó el estado de activación de la IRF-3 (p-IRF-3) en las fracciones celulares (figura 7C). La p-IRF-3 sólo se observó en el núcleo de las células infectadas con la cepa estacional a las 12, 16 y 24 hpi (Figura 7C), sugiriendo que en la infección con la cepa estacional, la IRF-3 es activada por fosforilación y que a las 16 hpi, la IRF-3 se encuentra en mayor proporción modificada por SUMO-1 (Figura 7A) (en el núcleo) e interactuando con la NS1 (Figura 7B). En contraste, en la infección con la cepa pandémica, a las 12 hpi la NS1 interactúa con la IRF-3 tanto en la fracción citoplásmica como en la nuclear (Figura 7B). Esta interacción es independiente del estado de fosforilación de IRF-3 (7B y 7C). A las 16 hpi, se detectó la mayor interacción de la NS1 con la IRF-3 en la fracción nuclear y una ligera interacción en la fracción citoplásmica (Figura 7B). De manera interesante, la forma fosforilada de la IRF-3 se detectó en ambas fracciones celulares (Figura 7C), y la IRF-3-SUMO1 fue predominantemente nuclear (Figura 7A); fracción en donde la interacción entre NS1 e IRF-3 fue mayor (Figura 7B). A las 24hpi en la infección con la cepa pandémica, la interacción entre la NS1 y la IRF-3 en la fracción nuclear disminuyó drásticamente y la mayor interacción se observó en el citoplasma de las células infectadas. Estos resultados se correlacionan con los niveles de IRF-3-SUMO1 descritos en la sección anterior (Figura 7B y 7A).

Estas observaciones sugieren una regulación diferencial de IRF-3 dependiendo de la cepa viral, el compartimiento celular y el tiempo de infección. Además, que la regulación de la interacción entre IRF-3 y NS1 es de manera espacial y temporal. En conjunto, estos resultados sugieren una compleja red de interacciones a nivel molecular entre la proteína viral NS1 y las diferentes formas de IRF-3 (p-IRF-3 e IRF-3-SUMO1) y compartimientos celulares para inhibir la respuesta antiviral de la célula mediada por IFN-I en la infección por influenza H1N1 tipo A.

6.3. La SUMOilación de IRF-3 se correlaciona con una menor expresión de IFN- β

A la fecha, no se conoce con detalle el mecanismo molecular por el cual la NS1 inhibe la producción del IFN tipo I mediado por IRF-3. Una opción es que la NS1 module la SUMOilación de la IRF-3 para disminuir la transcripción del gen de *ifn*, inhibiendo así, la respuesta antiviral de la célula. Por lo que, inicialmente se cuantificó mediante ensayos de Elisa, la cantidad total de IRF-3 SUMOilada (SUMO-1, SUMO-2 y SUMO-3) en las fracciones celulares (Figura 8A), tanto en la infección con la cepa pandémica, como con la cepa estacional, a las 12, 16 y 24 hpi. Como se muestra en la figura 8A, la IRF-3 SUMOilada fue estadísticamente significativa más alta en la infección con la cepa pandémica *versus* la cepa estacional. De manera interesante, a las 12hpi en la fracción citoplásmica de las células infectadas con la cepa pandémica, el porcentaje de IRF-3 SUMOilado incrementó 5 veces aproximadamente comparado con la infección estacional. En contraste, en la fracción nuclear el porcentaje de IRF-3 modificado por SUMO fue similar en ambas cepas virales. A las 16hpi, en la fracción nuclear se cuantificó el mayor porcentaje de IRF-3/SUMO tanto en la cepa estacional como en la pandémica. Aunque a las 16 hpi se observó una diferencia significativa en la cantidad de SUMO-IRF-3 entre ambas cepas (Figura 8A). A las 24hpi, se cuantificó muy poca IRF-3 modificada por SUMO en la fracción nuclear en la infección con ambas cepas virales. En contraste, a las 24 hpi en la fracción citoplásmica se cuantificó la mayor cantidad de IRF-3-SUMO (Figura 8A). Estos resultados sugieren que en la infección con la cepa pandémica se favorece la SUMOilación de la IRF-3. Aunado a esto, la SUMOilación de IRF-3 en la cepa pandémica ocurre en una etapa más temprana del ciclo de replicación viral y en la fracción citoplásmica (Figura 8A y 7A). La mayor cantidad de IRF-3 SUMOilada se observó a las 16hpi en la infección con ambas cepas virales; en este tiempo se observó la mayor interacción nuclear entre NS1 e IRF-3 (Figura. 7B). Todos estos resultados sugieren que la SUMOilación de IRF-3 en la fracción nuclear podría regular negativamente la expresión del gen de *ifn- β* .

Con la finalidad de correlacionar el diálogo molecular entra la fosforilación de la IRF-3 (Figura 7C), la SUMOilación de IRF-3 (Figura 7A y 8A), su interacción con la NS1 (Figura 7B), con respecto a la expresión del gen de *ifn- β* (Figura 8B), se realizaron ensayos de RT-PCR cuantitativos utilizando el método de Taqman. Se cuantificó la expresión del gen de *ifn- β* y del gen celular *gapdh* (control de expresión endógena) en células no infectadas e infectadas por Influenza estacional y pandémica a diferentes tiempos del ciclo de replicación

viral (12, 16 y 24 hpi). A las 12 hpi se muestra un incremento en la expresión del gen de *ifn-β* en la infección estacional y pandémica. Sin embargo, en la infección por Influenza estacional la inducción de la expresión del mensajero de *ifn* es mayor comparado con la expresión en la infección por el virus pandémico. De manera interesante, a las 16 hpi se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la infección estacional versus la pandémica (Figura 8B). En células infectadas con la cepa pandémica, el nivel de expresión del mensajero de IFN-β disminuyó más de 2 veces comparado con la cepa estacional.

Hacia las 24 hpi, en la infección con la cepa estacional se cuantificó una disminución de 4.5 veces en la expresión del gen *ifn*, comparado con las 12 hpi. Estos resultados sugieren que la SUMOilación de la IRF-3 en el núcleo de la célula infectada con la cepa pandémica, correlaciona con una disminución en la expresión del IFN-β. En contraste, durante la infección con la cepa estacional, el incremento de la IRF-3 SUMOilada en el núcleo de la célula, no correlaciona con una disminución en la transcripción del gen de *ifn-β*. En conjuntos estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual la proteína viral NS1 bloquea la expresión de IFN-β vía IRF-3 es diferente y dependiente de la cepa de Influenza y se relaciona con la capacidad de modificar a la IRF-3 en diferentes compartimentos celulares (citoplasma o núcleo) y el tiempo de infección.

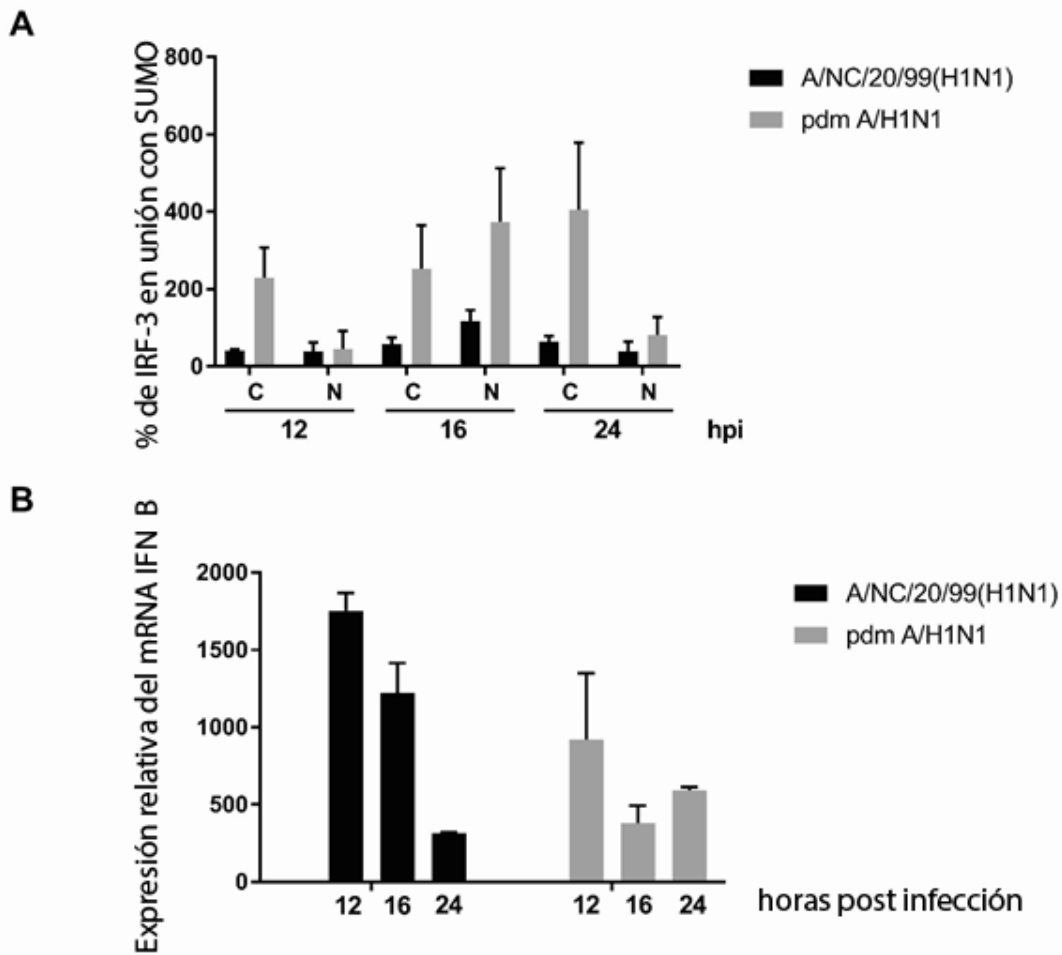


Figura 9 A) Cuantificación de SUMO-IRF-3 y B) cuantificación de la expresión del mensajero de IFN- β .
A) Los extractos nucleares y citoplásmicos de células A549 no infectadas e infectadas por Influenza H1N1 estacional o pandémica, obtenidos a diferentes tiempos de la infección (12, 16 y 24 hpi) fueron incubados con el anti-IRF-3. Posteriormente se adicionó el anticuerpo que detecta a SUMO total y después del tiempo de incubación, se adicionaron las soluciones reporteras y reveladoras, las cuales inducen un cambio de color en las muestras. El cambio colorimétrico en las muestras fue medido por absorbancia y los datos se correlacionaron con los controles positivos y negativos para cuantificar el porcentaje de la SUMOilación de IRF-3 total durante infección. **B)** Se realizó RT-PCR cuantitativo a partir de células A549 no infectadas o infectadas con influenza estacional o pandémica a diferentes tiempos del ciclo de replicación viral para determinar el nivel de expresión del mRNA del IFN- β por el método de Δ Ct. Los valores de tres experimentos independientes fueron analizados y graficados como expresión relativa del gen de ifn basado en los valores de expresión del gen endógeno GAPDH.

7. DISCUSIÓN

En una infección viral, el RNA generado por el virus actúa como un patógeno asociado a una vía molecular (PAMP) activando RNA helicasas tipo RIG-1 que resulta en una cascada de señalización para fosforilar y traslocar al núcleo factores de regulación de interferón (IFN) como IRF-3 e IRF-7, esto conlleva en la expresión de IFN-1 (IFN- α e IFN- β) que es la principal defensa ante una infección viral (Goswami et al., 2013). Se ha demostrado en algunas cepas de influenza, que la proteína NS1 inhibe la cascada de señalización IRF-3 y como resultado no se activa la transcripción del gen de *ifn*. Sin embargo, no se conoce con detalle el mecanismo molecular por el cual se logra esta inhibición. En este trabajo, estudiamos el mecanismo molecular por el cual se regula la IRF-3 durante la infección con dos cepas de influenza H1N1 tipo A, una estacional y otra pandémica (Figura 7A y 7C). La IRF-3 es un factor de transcripción esencial para inducir la expresión del tipo I de Interferón, el cual, durante la infección por el virus de influenza este es regulado por su interacción con la proteína viral NS1, modificaciones post-traduccionales, diferente localización sub-celular y dependencia de la cepa viral. La activación de la IRF-3 mediada por su fosforilación se ha estudiado a detalle. La IRF-3 en una célula no infectada se localiza preferencialmente en el citoplasma. Cuando ocurre una infección viral, la IRF-3 es fosforilada y translocada al núcleo de la célula donde puede unirse al complejo de proteínas CBP/p300 para inducir la transcripción de sus genes blanco como el *ifn-I* (Killip et al., 2014). En este trabajo demostramos que la activación de la IRF-3 difiere en la infección con la cepa pandémica *versus* la estacional (Fig. 7C). Se observó un retraso en la activación (p-IRF-3) y translocación nuclear de la IRF-3 en células infectadas con la cepa pandémica comparado con la cepa estacional. Además, la localización de la p-IRF-3 difiere entre las dos cepas virales: mientras que en la infección con la cepa estacional la IRF-3 fosforilada se encontró en el núcleo de la célula, en la infección con la cepa pandémica se observó tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 7C). Estos resultados sugieren que la cepa pandémica es más eficiente para abatir la activación de la respuesta antiviral de la célula para inhibir la expresión del IFN-I. También sugiere que la regulación de la IRF-3 depende de las interacciones que se establezcan entre proteínas celulares en diferentes compartimientos celulares. Recientemente, se reportó que dos proteínas adaptadoras MAVS y STING, interaccionan con la IRF-3 de manera dependiente a su estado de fosforilación (Zhao et al., 2016), La IRF-3 fosforilada se disocia de las proteínas adaptadoras, se dimeriza y se transloca al núcleo para inducir la expresión del IFN-I. Sánchez-Aparicio *et. al.* reportó la dinámica de las interacciones entre estas proteínas

demostrando que la regulación de estos complejos dependen del espacio y del tiempo. También observaron que la proteína NS1 del virus modifica la dinámica de la formación de los complejos para poder atacar a la activación de la respuesta antiviral de la célula. En este trabajo se estableció que la IRF-3 es diferencialmente modificada por la unión de SUMO-1 en la infección de células por la cepa estacional y pandémica (Figura 7A). En un esfuerzo para entender la dinámica de la regulación de la IRF-3 después de la infección viral, se realizaron ensayos bioquímicos para determinar dónde la IRF-3 es modificada post-traduccionalmente (Figura 7A y 7C) y en qué momento del ciclo de replicación viral ocurre. También evaluamos en qué compartimento celular (núcleo o citoplasma) la NS1 interacciona con la IRF3 (Figura 7B). Nuestros resultados muestran una correlación entre la SUMOilación de la IRF-3 y la expresión del gen de *ifn*. Como se muestra en la figura 8, la regulación de la IRF-3 y en consecuencia la expresión del gen de IFN- β en la infección por la cepa estacional es independiente del estado de SUMOilación de la IRF-3. Como se esperaba, en la infección con la cepa estacional se induce la activación de la IRF-3 vía su fosforilación y como consecuencia se observó una mayor cantidad de p-IRF-3 en el núcleo de la célula; como factor de transcripción induce la expresión de IFN- β . En la fase tardía del ciclo de replicación viral, la IRF-3 nuclear es modificada por la unión de SUMO-1. Sin embargo, no se observó una disminución dramática en la expresión del gen de *ifn*. Al mismo tiempo, se detectó la interacción de la NS1 con la IRF-3 en el núcleo de la célula infectada, sugiriendo que durante la infección con la cepa estacional la mayor producción del mensajero de IFN- β podría depender de otros factores transcripcionales como NF-KB o que la SUMOilación de la IRF-3 no lo convierte en un represor transcripcional. De manera interesante, a las 24 hpi en la fracción nuclear se detectó una disminución en la cantidad de IRF-3-SUMO-1, poca IRF-3 fosforilada y una ligera interacción entre la IRF-3 y la NS1, sin embargo, hubo una disminución significativa en la expresión de IFN- β , lo cual indica que la regulación transcripcional del IFN-I en la infección de la cepa estacional es independiente del estado de SUMOilación de la IRF-3. En contraste, en la infección por la cepa pandémica se detectó a la IRF-3 SUMOilada desde un tiempo temprano de la infección, en el citoplasma y en el núcleo de la célula de manera independiente a su estado de fosforilación, además la IRF-3 estaba interaccionando con la proteína viral NS1 en el citoplasma y en el núcleo celular. Estos resultados sugieren que las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la NS1 (disminución del número de residuos de aminoácidos y las sustituciones en los residuos 103 y 106) entre la cepa estacional y pandémica altera la dinámica de las interacciones que establece y por ende, del mecanismo para inhibir la

respuesta antiviral de la célula y además, que la regulación de la IRF-3 en la infección por la cepa pandémica inicia temprano y en el citoplasma de la célula.

Esta cepa viral explota mejor el mecanismo celular de SUMOilación para atacar a las defensas celulares. La SUMOilación de la IRF-3 y la interacción con la NS1 se correlacionan con una caída significativa en la expresión del IFN- β . Estos resultados sugieren que la cepa pandémica modifica a la IRF-3 por SUMO-1 y disminuye la transcripción, sugiriendo un nuevo mecanismo por el cual la cepa pandémica inhibe la respuesta antiviral de la célula.

8. CONCLUSIONES

-El factor de transcripción IRF-3 es modificado diferencialmente por la unión de SUMO1 durante la infección por influenza H1N1 estacional y pandémica.

-La proteína viral NS1 interacciona con IRF-3 en diferentes compartimientos celulares.

-La SUMOilación de IRF-3 se correlaciona con una menor expresión de IFN- β en la infección con la cepa pandémica.

9. REFERENCIAS

Abdelwhab, E. M., Veits, J., & Mettenleiter, T. C. (2013). A small protein with diverse and versatile functions Avian influenza virus NS1, 583–588.

Ayllon, J., & Garcia-Sastre, A. (2015). The NS1 Protein: A Multitasking Virulence Factor. En M. A. Oldstone & R. W. Compans (Eds.), *Influenza Pathogenesis and Control* (Vol. II, pp. 73–107). Springer. https://doi.org/10.1007/82_2014_400

Centers for Disease Control and Prevention. (2016). Flu Symptoms & Complications.

Egli, A., Santer, D. M., O'Shea, D., Tyrrell, D. L., & Houghton, M. (2014). The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerging Microbes & Infections*, 3(May), e51. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.51>

Everett, R. D., Boutell, C., & Hale, B. G. (2013). Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nature reviews. Microbiology*, 11(6), 400–11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3015>

- Everett, R. D., & Chelbi-Alix, M. K. (2007). PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie*, *89*(6–7), 819–830.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.004>
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., & Skalka, A. M. (2015). *Principles of Virology*. (S. J. Flint, A. M. Skalka, & V. R. Racaniello, Eds.) (4a ed.). ASM Press.
- Goswami, R., Majumdar, T., Dhar, J., Chattopadhyay, S., Bandyopadhyay, S. K., Verbovetskaya, V., ... Barik, S. (2013). Viral degradasome hijacks mitochondria to suppress innate immunity. *Cell research*, *23*(8), 1025–42.
<https://doi.org/10.1038/cr.2013.98>
- Hale, B. G., Albrecht, R. A., & García-Sastre, A. (2010). Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future microbiology*, *6*2623, 1–29.
<https://doi.org/10.2217/fmb.09.108>
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J., & Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, *89*(10), 2359–2376.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004606-0>
- Hale, B. G., Steel, J., Medina, R. a, Manicassamy, B., Ye, J., Hickman, D., ... García-Sastre, A. (2010). Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *Journal of virology*, *84*(14), 6909–6922.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00081-10>
- Han, Q., Chang, C., Li, L., Klenk, C., Cheng, J., Chen, Y., ... Xu, K. (2014). Sumoylation of influenza a virus nucleoprotein is essential for intracellular trafficking and virus growth. *Journal of virology*, *88*(16), 9379–90. <https://doi.org/10.1128/JVI.00509-14>
- Honda, K., & Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology*, *6*(9), 644–658. <https://doi.org/10.1038/nri1900>
- Killip, M. J., Fodor, E., & Randall, R. E. (2015). Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Research*, *209*, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.003>
- Killip, M. J., Smith, M., Jackson, D., & Randall, R. E. (2014). Activation of the interferon induction cascade by influenza A viruses requires viral RNA synthesis and nuclear export. *Journal of Virology*, *88*(8), 3942–3952. <https://doi.org/10.1128/JVI.03109-13>

- Krug, R. M. (2015). Functions of the Influenza A virus NS1 protein in antiviral defense, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.007>. Functions
- Kuo, R.-L., Zhao, C., Malur, M., & Krug, R. M. (2010). Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon- β transcription. *Virology*, *408*(2), 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.09.012>. Influenza
- Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2009). PML Nuclear Bodies Introduction. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, *2*, 1–6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000661>
- Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P. M., & Hiscott, J. (1999). Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Molecular and cellular biology*, *19*(2), 959–966. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.2.959>
- López-Tercero, N. A. (2015). *Efecto de la proteína viral NS1 sobre la activación de IRF-3 en la infección por el virus de Influenza H1N1/A*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Maroui, M. A., El Asmi, F., Dutrieux, J., Chelbi-Alix, M. K., & Nisole, S. (2014). Implication des corps nucléaires PML dans l'immunité intrinsèque et innée. *Medecine/Sciences*, *30*(8–9), 765–771. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143008014>
- Medina, R. A., & García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 590–603. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2613>
- Na, W., Lyoo, K. S., Yoon, S. W., Yeom, M., Kang, B., Moon, H., ... Song, D. (2016). Attenuation of the virulence of a recombinant influenza virus expressing the naturally truncated NS gene from an H3N8 equine influenza virus in mice. *Veterinary Research*, *47*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0400-7>
- Pal, S., Santos, A., Rosas, J. M., Ortiz-Guzman, J., & Rosas-Acosta, G. (2011). Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection. *Virus Research*, *158*(1–2), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.017>
- Paun, A., & Pitha, P. M. (2007). The IRF family, revisited. *Biochimie*, *89*(6–7), 744–753. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.014>
- Santos, A., Chacón, J., & Rosas-acosta, G. (2013). Influenza A Virus Multiplication and the

- Cellular SUMOylation System. En G. Rosas-Acosta (Ed.), *Viral replication*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54351>
- Santos, A., Pal, S., Chacón, J., Meraz, K., Gonzalez, J., Prieto, K., & Rosas-Acosta, G. (2013). SUMOylation affects the interferon blocking activity of the influenza A nonstructural protein NS1 without affecting its stability or cellular localization. *Journal of virology*, 87(10), 5602–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02063-12>
- Shaw, M. L., & Palese, P. (2013). Orthomyxoviridae. En D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6a ed., pp. 1151–1185). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D. H. (2005). TYPE I INTERFERONS ([alpha]/[beta]) IN IMMUNITY AND AUTOIMMUNITY. *Annual Review of Immunology*, 23, 307–36. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843>
- Wagner, E. K., Hewlett, M. J., Bloom, D. C., & Camerini, D. (2007). *Basic Virology* (3a ed.). Wiley-Blackwell.
- Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2010). Mechanisms , regulation and consequences of protein SUMOylation proteins. *Biochemistry Journal*, 145, 133–145. <https://doi.org/10.1042/BJ20100158>
- World Health Organization. (2010). WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses. *WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses*, (February), 1–32. Recuperado a partir de <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:WHO,2010#7>
- Wright, P. F., Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2013). Orthomyxoviruses. En D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6a ed., pp. 1185–1243). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Wu, C.-Y., Jeng, K.-S., & M-C Lai, M. (2011). The SUMOylation of Matrix Protein M1 Modulates the Assembly and Morphogenesis of Influenza A Virus. *Journal of Virology*, 85(13), 6618–6628. <https://doi.org/10.1128/JVI.02401-10>
- Xu, K., Klenk, C., Liu, B., Keiner, B., Cheng, J., Zheng, B. J., ... Sun, B. (2011).

Modification of nonstructural protein 1 of influenza A virus by SUMO1. *J Virol*, 85(2), 1086–1098. <https://doi.org/10.1128/JVI.00877-10>

Ysebrant de Lendonck, L., Martinet, V., & Goriely, S. (2014). Interferon regulatory factor 3 in adaptive immune responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(20), 3873–3883. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1653-9>

Zhao, B., Shu, C., Gao, X., Sankaran, B., Du, F., & Shelton, C. L. (2016). Structural basis for concerted recruitment and activation of IRF-3 by innate immune adaptor proteins. *PNAS Plus*, 113(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.1603269113>