



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Papel de la ubiquitinación en la replicación del
astrovirus neurotrópico VA1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

JAQUELINE GOMEZ REYES

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ**



Ciudad Universitaria, CDMX., 2024



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.

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi familia, a mis padres por apoyarme siempre. A mi sobrino por dar luz a mi vida. A mis perritas Kitty y Canela por acompañarme en esas famosas desveladas de estudio. Y a mi amiga Alin, por su compañía y sus consejos.

Quiero agradecer a mi tutor el Dr. Tomás López, por todo su apoyo y por enseñarme tanto de virología. Así como a mi jurado revisor el Dr. Carlos Sandoval, el Dr. José Luis Puente, el Dr. José Eduardo Bustamante y el Dr. Alejandro Jácome, por el impacto que han causado en mi formación como bióloga.

Por último, me gustaría agradecer a la Dra. Susana López y Dr. Carlos Arias por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio. Quiero ofrecer un agradecimiento a la técnico del laboratorio la Dra. Rafaela Espinosa, por su apoyo durante todo el proyecto.

Este trabajo fue apoyado por las subvenciones IN210120 de la DGAPA-UNAM.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Generalidades.....	8
1.2. Genoma y estructura viral.....	9
1.3. Ciclo de replicación.....	12
1.4. Características particulares de VA1.....	14
1.5. Sistema ubiquitina-proteosoma.....	15
1.6. Características de la ubiquitina.....	15
1.7. Ubiquitinación.....	17
1.8. Inhibidor de la ubiquitinación.....	19
2. ANTECEDENTES.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos particulares.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1. Células, virus y reactivos.....	23
6.2. Infección y tratamiento con Pyr-41.....	23
6.3. Determinación de la progenie viral	24
6.4. Determinación de la producción de proteínas virales.....	24
6.5. Determinación de la viabilidad celular.....	25
6.6. Determinación de la infectividad.....	26

6.7. Análisis estadísticos.....	26
7. RESULTADOS.....	27
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIONES.....	39
10.PERSPECTIVAS.....	40
11.REFERENCIAS.....	41

12. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae, basada en la secuencia de aminoácidos del ORF2.....	8
Figura 2. Crio-microscopia electrónica (Crio-EM) y estructura cristalográfica de HAstV y HEV.....	10
Figura 3. Organización del genoma de astrovirus y la síntesis de proteínas no estructurales.....	11
Figura 4. Replicación del genoma de astrovirus y la síntesis de proteínas estructurales.....	12
Figura 5. Ciclo de replicación de los astrovirus clásicos.....	13
Figura 6. Estructura de la ubiquitina y sus residuos de lisina.....	16
Figura 7. Esquema de la ubiquitinación mediada por el Sistema Ubiquitina-Proteosoma.....	18
Figura 8. La inhibición de la ubiquitinación reduce la producción de progenie y síntesis de proteínas.....	28
Figura 9. La expresión de proteínas virales y la producción de progenie virales se reducen significativamente a una dosis de 100 μ M de Pyr-41.....	30
Figura 10. La inhibición de la ubiquitinación afecta a la infección de VA1 en etapas tempranas.....	33
Figura 11. Figura 11. Papel de la ubiquitinación en la entrada y desnudamiento viral.....	37

RESUMEN

Los astrovirus son patógenos capaces de infectar aves y mamíferos, principalmente; los astrovirus humanos clásicos (HAstV) se han asociado a gastroenteritis viral en niños. Sin embargo, también se han registrado casos de encefalitis fatal causada por astrovirus, siendo VA1 el astrovirus que se presenta con mayor frecuencia en infecciones del sistema nervioso central.

Se ha demostrado que el Sistema Ubiquitina-Proteosoma es necesario en el ciclo replicativo del astrovirus HAstV-8, así como en VA1. Se reportó que la cepa Yuc-8 de HAstV-8 requiere de la actividad del proteosoma en las primeras etapas del ciclo replicativo, además de que también requiere de ubiquitinación para la producción de progenie y proteínas virales. A la fecha, se desconoce el papel de la ubiquitinación en el ciclo replicativo de VA1, sin embargo se sabe que requiere del proteosoma para su replicación, ya que se ha reportado que la inhibición del proteosoma disminuye significativamente la producción de progenie viral.

Al no existir reportes de que VA1 requiera del proceso de ubiquitinación durante su ciclo replicativo, se investigó el papel de la ubiquitinación en la producción de progenie viral y producción de proteínas virales, haciendo uso del inhibidor de ubiquitinación, Pyr-41.

En este trabajo se demostró que la ubiquitinación es necesaria en las primeras etapas del ciclo replicativo de VA1. Se demostró que la producción de progenie y proteínas virales disminuyen significativamente al inhibir la ubiquitinación con Pyr-41, de forma dependiente a la dosis. Al comparar el efecto de Pyr-41 en diferentes etapas de la replicación, se observó que la producción de progenie y de proteínas virales es menor en las primeras horas de infección, principalmente cuando Pyr-41 fue añadido durante la absorción del virus a las células. El mismo efecto se observó de forma más clara en la infectividad del virus, pues a estas horas la infectividad disminuye casi a cero.

A pesar de que se demostró la importancia de la ubiquitinación en la replicación de VA1 y de que se logró identificar en qué etapa es necesaria, aún quedan muchas interrogantes por profundizar. Es de interés conocer si la ubiquitinación es necesaria para la entrada del virus, si actúa en una proteína celular o viral y si esta es mandada a degradación o no.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La familia *Astroviridae* es un grupo de virus conformado por dos géneros: *Mamastrovirus*, que agrupa a aquellos astrovirus capaces de infectar mamíferos, y *Avastrovirus*, que incluye a todos los virus que logran infectar aves (Arias & López, 2016). Sin embargo, se han identificado nuevos genomas de astrovirus en otros animales vertebrados, como anfibios, reptiles y peces; así como de genomas similares a astrovirus en plantas e invertebrados (Fig. 1). Aún no se ha determinado cómo se clasificarán estos virus, ya sea como miembros de la familia *Astroviridae* o no (Janowski, 2021).

Entre los astrovirus que infectan al ser humano existen tres clados. El primero de estos clados incluye a los ocho serotipos llamados clásicos (HAstV1-8); sin embargo, en los últimos años se han registrado dos nuevos clados denominados MLB y HMO/VA (De Benedictis, 2011).

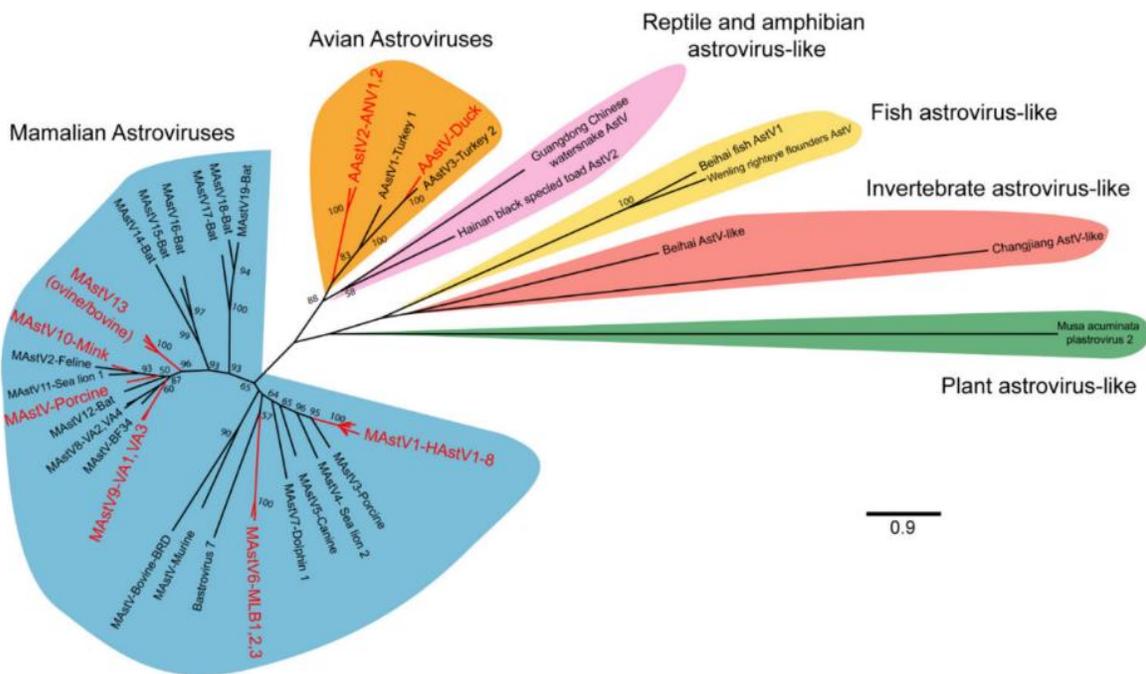


Figura 1. Relaciones filogenéticas dentro de la familia *Astroviridae*, basada en la secuencia de aminoácidos del ORF2. La familia está conformada por dos géneros: *Mamastrovirus* y *Avastrovirus*. Este árbol se realizó a partir de 53 genomas de astrovirus, que incluye a las 22 especies reconocidas por la ICTV. Los clados de astrovirus que se han detectado en enfermedades extraintestinales están resaltados en rojo. MAstV: mamastrovirus; AAstV: avastrovirus; HAstV: astrovirus humano; AstV: astrovirus (Tomada de: Janowski, 2021).

A pesar de que muchas de las infecciones por astrovirus tienden a ser asintomáticas (Johnson, et al., 2017), los astrovirus humanos clásicos (HAstV) son patógenos gastrointestinales responsables de aproximadamente el 10% de los

casos de gastroenteritis aguda no bacteriana en niños (Bosch, et al., 2014). También se ha informado que los HAstV pueden causar encefalitis fatal, principalmente en huéspedes inmunocomprometidos. Hasta la fecha, se han notificado 13 casos de infección del sistema nervioso central (SNC) por HAstV, siendo VA1 el virus que se ha encontrado con mayor frecuencia en este tipo de infecciones (Bami, et al., 2022; Maximova et al., 2023).

1.2 Genoma y estructura viral

Los astrovirus se observaron por primera vez en 1975, mediante microscopía electrónica (EM) en muestras de heces de niños con diarrea y vómito. En estas primeras observaciones se les asignó el nombre de astrovirus, ya que observaron partículas con forma de estrella (*astron* en griego); el análisis ultraestructural EM de HAstV infeccioso mostró partículas esféricas salpicadas de púas con un diámetro de ~410 Å (Dryden, et al., 2012).

Las partículas maduras e inmaduras de HAstV muestran una simetría icosaédrica $T=3$ con un diámetro de ~43 nm, tienen una capa denominada como *core* y una capa externa compuesta por espículas globulares (Arias & DuBois, 2017). La maduración de las partículas infecciosas de HAstV clásicos requiere del procesamiento por tripsina; en su forma inmadura se observan 90 espículas diméricas, mientras que en el estado maduro se observan 30 espículas (Dryden, et al., 2012) (Fig. 2). Los viriones inmaduros están formados por la poliproteína VP70 y los maduros están formados por las proteínas procesadas VP34 y VP25.

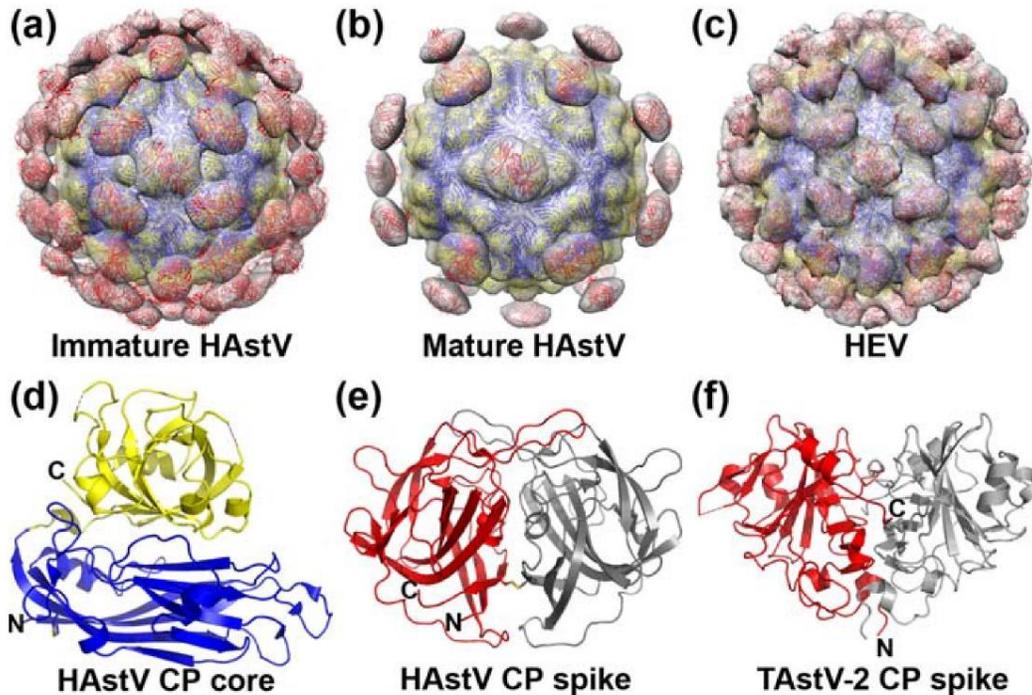


Figura 2. Crio-microscopía electrónica (Crio-EM) y estructura cristalográfica de HAstV y HEV. a) Modelo de partículas inmaduras, obtenido a partir de Crio-EM. b) Modelo de partículas maduras, digerido por tripsina, obtenido a partir de Crio-EM. c) Estructura de la cápside del virus de hepatitis (HEV) similar a HAstV, $T = 3$. d) Estructura cristalográfica del dominio central de la cápside de HAstV. e) Estructura cristalográfica de la espícula dimérica de HAstV. f) Estructura cristalográfica de la espícula dimérica del spike de astrovirus de pavo (TAstV-2) (Tomada de: Arias & DuBois, 2017).

El genoma de astrovirus posee cuatro marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés): ORF1a, ORF1b, ORF2 y ORFX (Lulla & Firth, 2020). Las proteínas no estructurales del virus son codificadas por ORF1a y ORF1b; estas proteínas son procesadas proteolíticamente y dan lugar a una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), una serina proteasa, una proteína ligada al genoma viral (VPg) y otras proteínas con funciones desconocidas (Fig. 3).

La expresión de la RdRp depende de un cambio en el marco de lectura posicionado entre el ORF1a y el ORF1b; este cambio de lectura da lugar a la proteína nsp1ab, la cual es procesada proteolíticamente para obtener la RdRp (Lewis & Matsui, 1995). En este sitio, el ribosoma brinca del ORF1a al ORF1b, para producir la poliproteína completa, que contiene a RdRp.

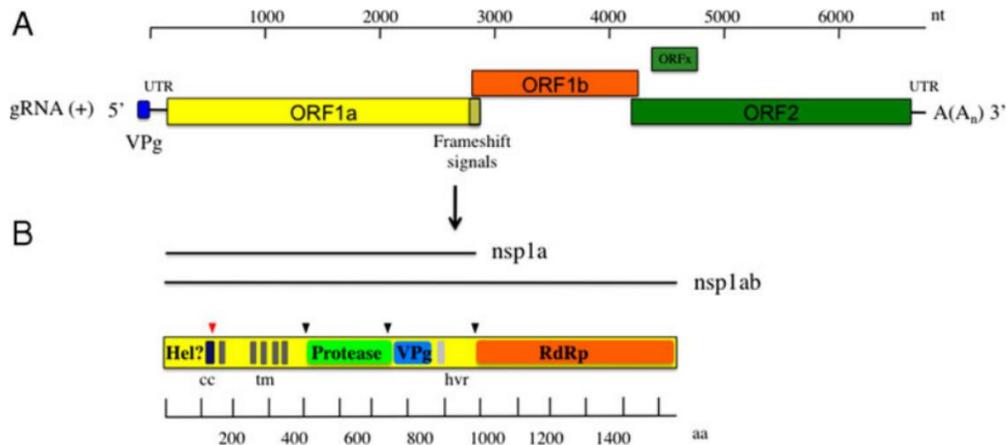


Figura 3. Organización del genoma de astrovirus y la síntesis de proteínas no estructurales. A) El RNA genómico de astrovirus es de cadena positiva y mide alrededor de 6.8 kb, posee una proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' y una cola de poli A en el extremo 3'. B) Las proteínas no estructurales de astrovirus se sintetizan a partir del ORF1a y ORF1b, el precursor nsp1a da origen a la proteína VPg, la proteasa, entre otras proteínas. Mientras que la polimerasa dependiente de RNA (RdRp) es sintetizada a partir de la poliproteína nsp1ab, la cual es traducida gracias a la presencia de un cambio de lectura entre el ORF1a y el ORF1b (Tomada de: Arias & López, 2016).

Al tercer marco de lectura se le denomina ORF2 y se encuentra en el extremo 3' del genoma; este codifica las proteínas estructurales, las cuales son obtenidas a partir de un precursor conocido como VP90 (Arias & DuBois, 2017). ORF1a y ORF1b se traducen a partir del RNA genómico (RNAg), mientras que ORF2 se traduce a partir de un RNA subgenómico (sgRNA) que se produce durante la infección por el virus (Fuentes, et al., 2012).

Las proteínas estructurales de HAstV se originan tras el procesamiento de la poliproteína VP90, la cual es cortada para generar una proteína más pequeña denominada VP70, que, a su vez, se procesa proteolíticamente por tripsina para dar origen a la forma madura, conformada por la cápside (VP34) y la espiga (VP25) (Fig. 4).

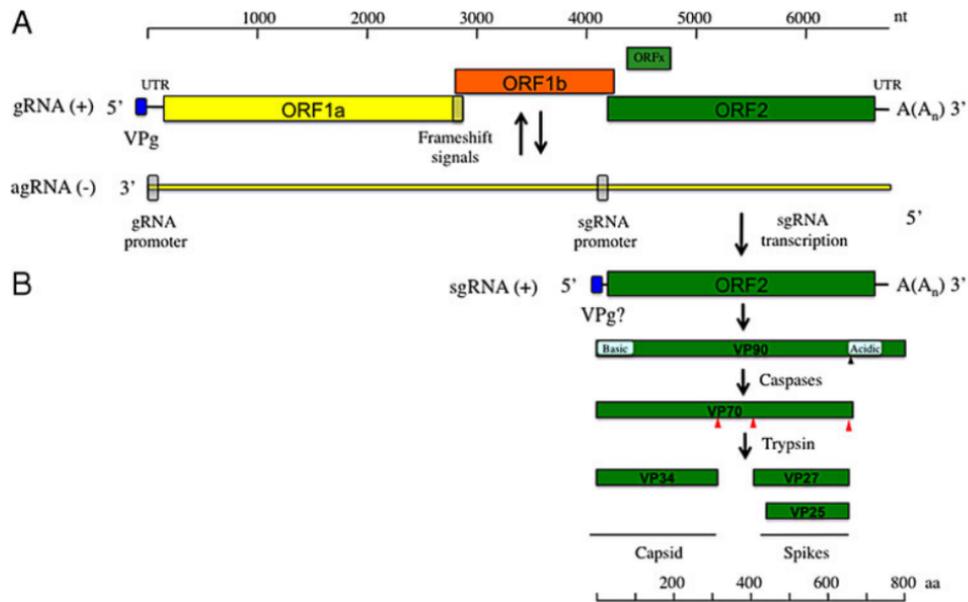


Figura 4. Replicación del genoma de astrovirus y la síntesis de proteínas estructurales. A) El genoma de astrovirus se usa como templado para sintetizar el RNA antigenómico (agRNA) de cadena negativa, que a su vez se usa como templado para sintetizar RNA genómico (gRNA) y subgenómico (sgRNA). B) El RNA subgenómico es traducido a la poliproteína VP90 que debe ser procesada por caspasas que origina a la poliproteína VP70 de 70 kDa, que requiere de la presencia de tripsina para madurar y obtener la forma infecciosa. Tras un proceso proteolítico se obtienen las proteínas estructurales, es decir, la cápside (VP34) y la espiga (VP27) (Tomada de: Arias & López, 2016).

En los últimos años, se ha reconocido un cuarto ORF y se le ha llamado ORFX; este ORF se sobrelapa con el ORF2 y se encuentra conservado en todos los HAstV clásicos. Este marco codifica la proteína XP, la cual juega un papel en el ensamblaje y/o liberación del virus, teniendo una actividad similar a una viroporina (Lulla & Firth, 2020).

1.3 Ciclo replicativo

A pesar de que no se conoce el ciclo replicativo de astrovirus en su totalidad, hay diferentes etapas bien caracterizadas. El ciclo de replicación inicia con la unión del virus al receptor de la célula, el cual es desconocido a la fecha. Sin embargo, se ha identificado al receptor Fc neonatal (FcRn) como un posible receptor de astrovirus, mediante la eliminación de los genes FCGRT o B2M, que codifican subunidades de FcRn. La ausencia de estos genes volvía a las células Caco-2 menos susceptibles a la infección; además por medio de ensayos ELISA se logró medir la afinidad de unión de VP27 y FcRn. Aunque FcRn se une directamente a VP27, el agotamiento de FcRn no perjudicó la unión de HAstV a la superficie celular (Haga, et al., 2022). Por lo tanto, FcRn es esencial para la infección de astrovirus, pero aún no queda claro su función como receptor.

Para que los astrovirus clásicos puedan infectar, deben activarse por una proteólisis mediada por tripsina. Los astrovirus clásicos entran a la célula huésped por endocitosis mediada por clatrina y libera su RNA genómico al citoplasma. Se sugiere que el virus debe llegar al endosoma tardío para liberar su genoma, ya que al silenciarse la expresión de Rab7, que es una GTPasa involucrada en la maduración de endosomas tempranos a tardíos, la infectividad del virus disminuyó un 50% (Méndez, et al., 2014).

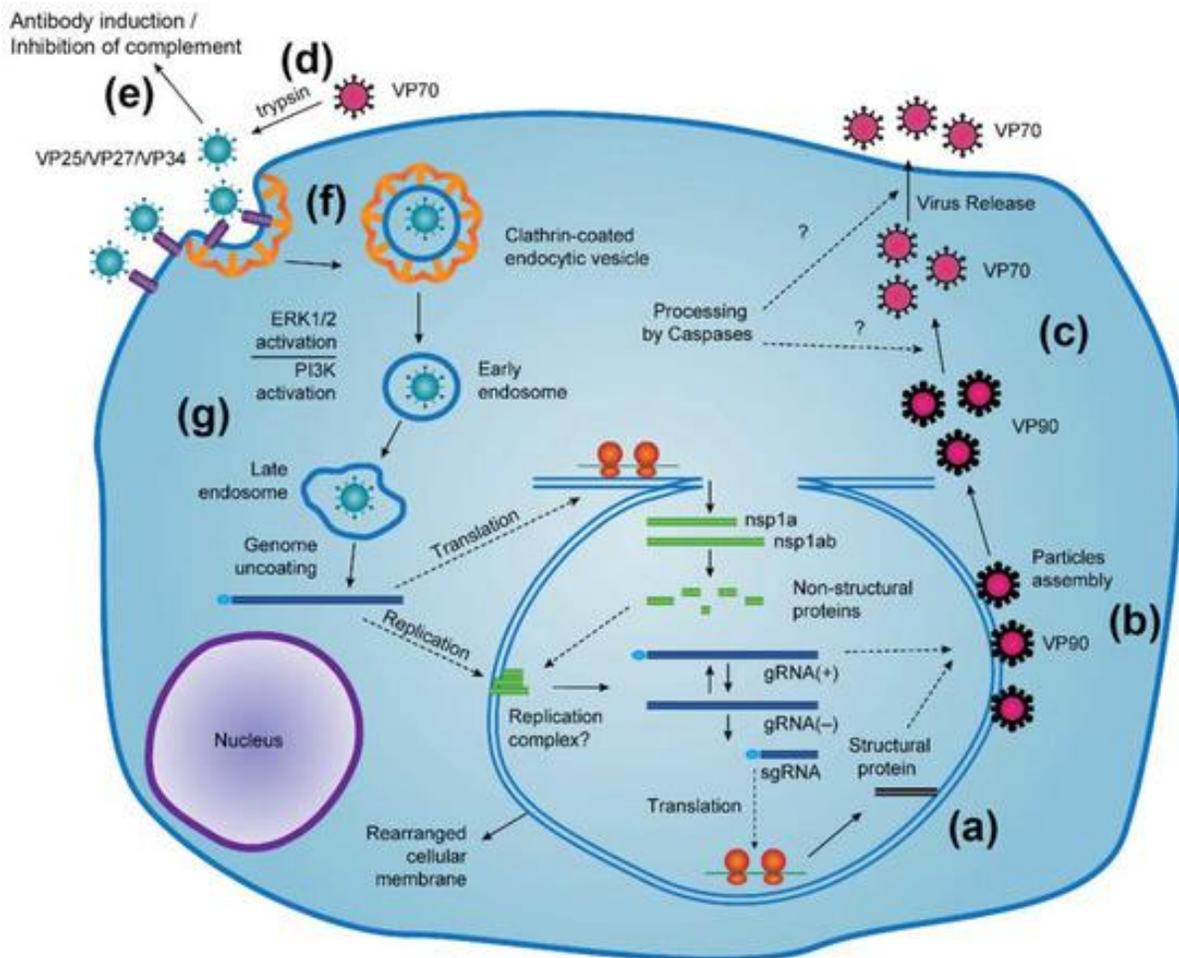


Figura 5. Ciclo de replicación de los astrovirus clásicos. a) Síntesis del precursor de las proteínas estructurales, a partir del RNA subgenómico (sgRNA), b) Ensamble del precursor VP90 con el genoma viral de RNA c) Proceso proteolítico de VP90 mediado por caspasas para formar VP70 y dar lugar a la liberación de partículas inmaduras, d) Proceso proteolítico de VP70 mediado por tripsina para producir partículas inefectivas de HAstV maduras conformadas por VP34, VP27 y VP25, e) Las partículas maduras provocan la inducción de anticuerpos, f) Unión y endocitosis mediada por clatrina de HAstV, g) Liberación del genoma del virus en el endosoma tardío. (Arias & Dubois 2017).

Una vez que el genoma se ha liberado, se usa el RNA genómico como mRNA para traducir las proteínas no estructurales, nsp1a y nsp1ab, a partir de los ORF1a y ORF1b. La proteína nsp1a genera cuatro posibles productos, del que sólo se han caracterizado a nsp1a/3 y nsp1a/4, que dan lugar a la proteasa viral y la VPg,

respectivamente. La proteína nsp1ab es codificada por el ORF1a y el ORF1b por medio de un mecanismo de cambio de lectura, dando origen a la RdRp. Esta señal se da por una secuencia heptamérica (A6C) y una estructura de tallo-asa, conservada en los astrovirus (Lewis & Matsui, 1995). Para que se procese co-traduccionalmente la proteína nsp1ab a nsp1a, es probable que se requiera la actividad de una proteasa celular en el extremo amino terminal (Mendez, et al., 2003).

Una vez sintetizadas y procesadas las proteínas no estructurales del virus, es posible iniciar la replicación del genoma viral, que aunque no está bien caracterizada se infiere que posee características de otros virus de ssRNA de polaridad positiva. Para iniciar la replicación, se usa de molde al RNA genómico (gRNA) para producir una copia completa de RNA antígenómico (agRNA) de cadena negativa, que, a su vez, se usa de molde para generar dos formas de RNA de cadena positiva. Una de las copias generadas es del genoma completo y es idéntica al gRNA parental, una parte de estas copias de gRNA se utilizan para sintetizar las proteínas no estructurales y otra parte se ensambla en las nuevas partículas virales que se generan. La otra forma de RNA producida a partir de agRNA se le denomina como RNA subgenómico (sgRNA), el cual se caracteriza por transcribirse a partir de un promotor interno, contener solo la secuencia del ORF2 y funcionar como mRNA para traducir las proteínas estructurales que se usarán para el ensamblaje.

El sgRNA da lugar a una proteína precursora denominada como VP90; los astrovirus clásicos se ensamblan en 180 copias de esta poliproteína VP90. Sin embargo, requiere de un proceso de caspasas para cortar a la VP90 cerca del extremo C-terminal, resultando en una proteína de 70 kDa denominada como VP70. El procesamiento de VP90 no es necesario para el ensamblaje, pero se requiere para la liberación del virus al citoplasma (Baños & Méndez, 2010; Méndez, et al., 2004). Una vez afuera, las partículas virales reinician el ciclo en las células no infectadas.

1.4 Características particulares de VA1

Desde su descubrimiento, los astrovirus se han aislado principalmente del tracto gastrointestinal; sin embargo, se han identificado astrovirus que infectan el sistema nervioso central (Janowski, 2021). En el caso de VA1, se ha detectado de forma independiente en el tejido cerebral de diversos casos de encefalitis humana.

El astrovirus VA1 fue identificado por primera vez en muestras fecales en 2008, tras un brote de gastroenteritis en una guardería en Virginia, EUA. Tras un análisis filogenético, se demostró que HAst-VA1 era más parecido a astrovirus que infectan a animales, en comparación con otras cepas de astrovirus humanos (Finkbeiner, et al., 2009).

Para la propagación de los astrovirus clásicos se requiere la adición de tripsina para la activación del virus y que este pueda entrar a la célula huésped, contrario a

lo que pasa en VA1 que puede propagarse sin la adición de tripsina (Janowski, et al., 2017). La proteína precursora de VA1 (VP86) no es procesada por tripsina, ni por caspasas, como ocurre en los HAstV clásicos. Sin embargo, se ha demostrado que VP86 es procesada intercelularmente por proteasas aún desconocidas, lo cual parece ser necesario para que el virus sea infeccioso (Aguilera-Flores, et. al, 2022). Esto podría relacionarse con la patología y el tipo de infección de cada grupo de virus, ya que se ha reportado que la tripsina se produce en mayor cantidad en el tracto gastrointestinal (Janowski, 2021).

1.5 Sistema Ubiquitina-Proteosoma (UPS, por sus siglas en inglés)

En las células eucariontes se degradan proteínas continuamente a péptidos y se reemplazan por proteínas recién sintetizadas (Goldberg, 2003). El Sistema Ubiquitina-Proteosoma es la principal vía de degradación de proteínas, siendo un proceso multienzimático que requiere de ATP. Su función principal es la degradación de proteínas mal plegadas o dañadas, sin embargo, lleva a cabo otras funciones como la regulación del nivel de proteínas relacionadas al control de la progresión del ciclo celular, tráfico de proteínas, transcripción, respuesta inmune y transducción de señales (Goldberg, 2007; Mitch & Goldberg, 1996).

Este sistema está conformado por dos componentes importantes, el primero es un complejo multiproteico denominado como proteosoma 26S, el cual es el encargado de la degradación de proteínas. El segundo componente es una proteína pequeña llamada ubiquitina, cuya principal función es marcar las proteínas y llevarlas a degradación, a través de un proceso llamado ubiquitinación, el cual requiere de ATP y diversas enzimas.

Actualmente existen diversos inhibidores de esta vía, siendo los más conocidos Bortezomib y MG132. Bortezomib se aprobó en 2003 como tratamiento para mieloma múltiple recidivante y refractario (RRMM), este fármaco se une selectiva y reversiblemente a la subunidad 26S del proteosoma, previniendo la degradación de proteínas y afectando diversas cascadas de señalización (Curran & McKeage, 2009). MG132 o Carbobencil-Leu-Leu-Leu-aldehído, es el inhibidor del proteosoma más usado en investigación, esto se debe a que es potente, no costoso y reversible. Este fármaco es un aldehído peptídico que inhibe a la subunidad 20S del proteosoma, uniéndose al sitio activo de las subunidades beta y bloquea eficazmente la actividad proteolítica del complejo del proteosoma 26S (Guo & Peng 2013).

1.6 Características de la ubiquitina

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada, que se une a otras proteínas a través de un enlace isopeptídico entre el residuo de glicina carboxilo terminal de la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de una lisina de la proteína diana. La ubiquitina es codificada por una familia de loci, los genes UBA52 y RPS27a codifican una sola copia de ubiquitina fusionada con proteínas

ribosómicas y los genes UbB y UbC codifican poliubiquitina, formando cadenas de 3 y 9 repeticiones de ubiquitina de cabeza a cola (Radici, et al., 2013).

La ubiquitina posee siete residuos de lisina (Fig. 6), los cuales se pueden ubiquitinar para dar lugar a cadenas de poli-ubiquitinas; también se pueden generar cadenas de ubiquitina 'lineales' unidas a Metionina iniciadora (Met1), cuando la ubiquitina se une al extremo N-terminal de una segunda ubiquitina. Estudios proteómicos muestran que todos los tipos de enlace son posibles en las células Komander, 2009; Swatek, & Komander, 2016).

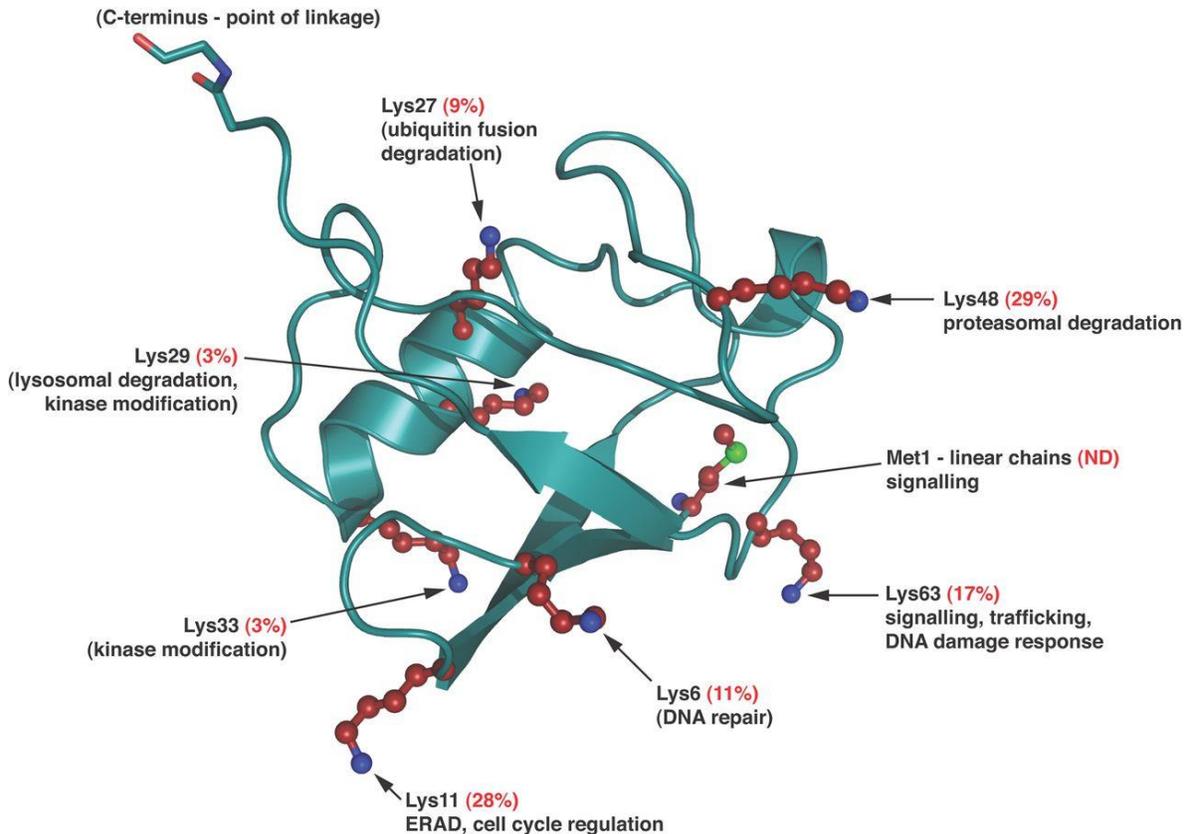


Figura 6. Estructura de la ubiquitina y sus residuos de lisina. La estructura de la ubiquitina se identifica de color verde, donde se observan los siete residuos de lisina (esferas azules) que permiten la unión a una proteína diana. En cada residuo se indica entre paréntesis la abundancia relativa del enlace particular en *S. cerevisiae* (Komander, 2009).

En un estudio proteómico cuantitativo, se analizó todo el contenido de ubiquitina en levadura, logrando determinar la abundancia relativa de cada tipo de enlace ubiquitina-ubiquitina (Xu, et al., 2009). Se encontró que el enlace más abundante es con la Lys 48, representando el 29% de todos los enlaces, seguido por los enlaces en la Lys 11 (Fig. 6). El tipo de unión en la cadena de ubiquitina establece la función de esta en la célula. Las cadenas unidas a Lys 48 tienen la función de dirigir las proteínas a degradación vía proteosoma, mientras que las que se unen a Lys 63 no poseen funciones degradativas, sino de señalización. El resto, que

podría considerar “atípicas”, poseen diferentes funciones como reparación de DNA, regulación de ciclo celular y modificaciones en la activación de quinasas.

La homeostasis de ubiquitina se mantiene gracias al reciclaje de cadenas de ubiquitina por enzimas desubiquitinadoras (DUB) y a la síntesis de novo (Radici, et al., 2013). A pesar de ser una proteína importante y abundante, no se produce en exceso debido a un sistema de reciclaje

1.7 Ubiquitinación

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona, cuyo principal objetivo es marcar proteínas para su degradación. Sin embargo, la ubiquitinación también participa en otros procesos de regulación como: el tráfico de proteínas, la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA, la apoptosis y la transducción de señales (Radici, et al., 2013). Este proceso requiere una activación inicial del grupo carboxilo terminal de la ubiquitina; dicha activación se da gracias a la enzima activadora E1 y una molécula de ATP. Este paso resulta en la formación de un intermediario ubiquitina-AMP y el producto final es la ubiquitina unida a E1 por un enlace tioéster. Posteriormente, la ubiquitina es transferida a una enzima conjugadora o E2 y se produce una cierta selectividad por los sustratos, pero la selectividad definitiva proviene de las enzimas ligasa o E3 (Mitch, & Goldberg, 1996). Estas enzimas reconocen uno o un conjunto de sustratos y catalizan la transferencia de la ubiquitina de E2 al sustrato, formando un enlace isopeptídico (Fig. 7).

Las enzimas E3 son las más heterogéneas en la vía de la ubiquitinación; estas enzimas se clasifican en tres tipos, según la presencia de dominios característicos y del mecanismo de transferencia de ubiquitina al sustrato. El tipo de E3 más abundantes son las RING E3s, las cuales se caracterizan por poseer un dominio de unión a zinc llamado RING o un dominio U-box, que es parecido a RING pero carece de zinc. Estos dominios son los responsables de unirse a la ubiquitina conjugada en E2 y estimular la transferencia. Las RING E3s median la transferencia directa de la ubiquitina al sustrato, funcionando como un andamio que orienta a la ubiquitina de E2 a su respectivo sustrato.

Las HECT E3s y las RBR E3 son otro tipo de E3 ligasas, que catalizan la transferencia de ubiquitina a través de dos reacciones. En la primera, la ubiquitina se transfiere a una cisteína catalítica de E3 y después pasa al sustrato, estos dos tipos de E3 ligasas se diferencian por presentar diferentes dominios catalíticos. Las HECT E3s presentan un dominio HECT en C-terminal de la proteína, se caracterizan por tener una estructura bilobular, donde el lóbulo N-terminal interactúa con E2 conjugado y el lóbulo C-terminal posee la cisteína catalítica. Mientras que las RBR E3 poseen dos dominios RING (RING1 y RING2) separados por un dominio intermedio RING (IBR), RING1 recluta a E2 conjugado con ubiquitina y RING2 posee la cisteína que cataliza la transferencia (Morreale, & Walden, 2016).

Una vez ubiquitinada la proteína diana, ésta se puede ir a degradación vía proteosoma, puede perder el enlace con ubiquitina o puede regular más funciones previamente descritas. Cuando la ubiquitina cumple su función, puede ser reciclada e iniciar un nuevo proceso de ubiquitinación (Fig. 7).

El proceso de ubiquitinación es dinámico y es reversible mediante la acción de enzimas conocidas como desubiquitininas (DUB), las cuales rompen el enlace isopeptídico entre los residuos de lisina de la proteína diana y la glicina C-terminal de la ubiquitina (D'Arcy, et al., 2015). Las DUBs se clasifican en seis clases: proteasas específicas de ubiquitina (USP), hidrolasas carboxi-terminales de ubiquitina (UCH), proteasas de tumor ovárico (OTU), proteasas de dominio proteico de la enfermedad de Machado-Joseph, JAMM/MPN asociado al dominiometalopeptidasas (JAMM) y proteína inducida por proteína quimiotáctica de monocitos (MCPIP). Todas ellas son cisteína proteasas a excepción de las JAMM, que pertenecen a la clase catalítica de las metaloproteasas (Fraile, et al., 2012)

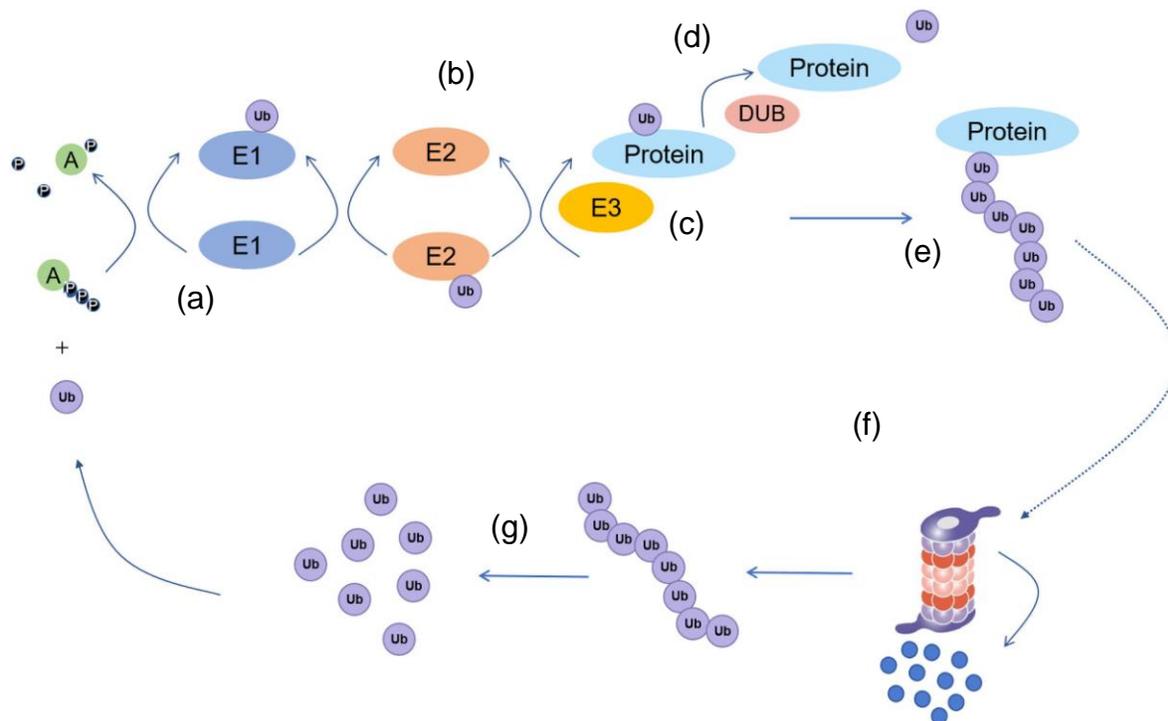


Figura 7. Esquema de la ubiquitinación mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma. a) Activación de la enzima E1 dependiente de ATP, formación de enlace tioéster entre la ubiquitina y E1, b) Conjugación de la ubiquitina, transferencia de E1 a E2, c) Transferencia de la ubiquitina al sustrato, formación del enlace isopeptídico de la ubiquitina a la proteína diana, (d) Desubiquitinación mediada por las enzimas desubiquitinadoras (DUB), e) Poliubiquitinación, formación de una cadena de poliubiquitina, f) Degradación de la proteína diana vía proteosoma, g) reciclaje de ubiquitina (Tomada de: Song, Y., et al, 2021).

1.8 Inhibidor de la ubiquitinación

El ácido 4[4-(5-nitro-furan-2-ilmetileno)-3,5-dioxo-pirazolidin-1-il] etil éster benzoico (PYR-41) es el primer compuesto permeable que inhibe la ubiquitinación, el cual inactiva la enzima activadora E1, impidiendo la formación del enlace tioéster de la E1 con la ubiquitina. La estructura de Pyr-41 sugiere que podría reaccionar con el sitio activo de cisteína de E1 (Yang, et al. 2007). Además de bloquear la ubiquitinación, PYR-41 aumenta la SUMOilación en células que poseen E1 sensible a la temperatura. También atenúa la activación del factor nuclear κ B mediada por citoquinas, debido a la inhibición de la ubiquitinación de (Lys-63) de TRAF6, lo cual es esencial para la activación de la quinasa I κ B (Yang, et al. 2007).

2. ANTECEDENTES

Los virus requieren de la maquinaria de la célula huésped para su replicación, maduración o liberación del virus, entre otras cosas. Diversos virus han desarrollado la capacidad de utilizar o manipular la vía ubiquitina-proteosoma del huésped a su favor. Por ejemplo, se ha sugerido que este sistema es necesario para que los virus puedan evitar la vigilancia inmunitaria del huésped, para la maduración viral y la liberación de la progenie viral, para la replicación viral eficiente y para la reactivación del virus desde la latencia (Gao & Luo, 2006).

Se ha demostrado que el Sistema Ubiquitina-Proteosoma es necesario para la replicación de astrovirus clásicos, específicamente en la cepa Yuc8 del astrovirus humano HAstV-8. Se demostró que al usar inhibidores del proteosoma como MG132, lactacistina y PSI se reducía la progenie viral de Yuc8, siendo MG132 el inhibidor más eficiente. Con este mismo inhibidor, se demostró que el sistema es necesario en los pasos tempranos de la replicación de Yuc8, debido a que el fármaco inhibió el rendimiento de la progenie viral en más de 1 logaritmo cuando se añadió al final del período de adsorción o a las 4 h posteriores a la adsorción (hpa). En este mismo reporte, se concluyó que la inhibición del proteosoma también afecta la producción de proteínas virales, ya que la acumulación tanto de la cápside como de la proteasa disminuyó en un 80 y un 60 % (Casorla-Pérez, et al., 2018). Todos estos datos sugieren que la actividad del proteosoma es necesaria en el ciclo replicativo de astrovirus clásico.

El tratamiento con MG132 reduce la síntesis de proteínas virales de Yuc8, esto podría deberse a una reducción del RNA viral. Mediante qRT-PCR se observó que la producción de sgRNA disminuyó en las primeras 12 horas de infección, mientras que la síntesis de agRNA disminuyó después de 24 horas de infección (Casorla-Pérez, et al., 2018). Por lo tanto, la actividad de proteosoma se requiere para la acumulación eficiente de sgRNA, que conduce a la síntesis de agRNA, sin acumulación de la cadena positiva no es posible la síntesis de la cadena negativa.

Al inhibir la ubiquitinación en la infección de Yuc8, ya sea silenciando el gen *ubc* o agregando Pyr-41 que inhibe la enzima E1, se observó una reducción de la progenie y las proteínas virales. En el caso de Pyr-41, la progenie se redujo con respuesta a la dosis y la síntesis de la proteína de la cápside y la proteasa viral se redujeron en aproximadamente un 80%. El silenciamiento de *ubc* mostró una reducción de más del 95%, similar a las células tratadas con MG132 o Pyr-41, así como una reducción significativa de las proteínas virales (Casorla-Pérez, et al., 2018). Estos ensayos, nos sugieren que la replicación de Yuc8 también requiere de ubiquitinación, pero no se descarta la posibilidad de que la ubiquitinación independiente del proteosoma sea necesaria para la replicación del virus.

No existen reportes donde se afirme que la ubiquitinación es necesaria para la replicación de VA1. Sin embargo, al tratar con inhibidores del proteosoma a células infectadas con VA1, se observó una disminución de 2 y 4 logaritmos en la progenie viral y una reducción en la producción de las proteínas virales, siendo los pasos tempranos de la infección los más afectados y se sugiere que el proteosoma es necesario en las primeras 12 horas (Jiménez, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La infección por astrovirus es una de las principales causas de gastroenteritis en humanos y animales, y en los últimos años se ha asociado con encefalitis fatal en humanos, principalmente por el astrovirus VA1.

El papel de la vía ubiquitina-proteosoma se ha reportado en el ciclo de replicación de astrovirus clásico, pero se desconoce el efecto de la inhibición de la ubiquitinación en la replicación del astrovirus neurotrópico VA1.

Conocer el papel de la ubiquitinación en la replicación viral de VA1 nos brindará una idea del mecanismo de secuestro que usa el virus durante la infección y usar esto a favor en el diseño de futuros tratamientos terapéuticos.

4. HIPOTESIS

La ubiquitinación es necesaria en la replicación del astrovirus VA1

5. OBJETIVOS

- Objetivo General

Determinar si la ubiquitinación es necesaria en el ciclo de replicación del astrovirus neurotrópico, VA1.

- Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la inhibición de la ubiquitinación en la producción de progenie y proteínas virales.

Determinar si la ubiquitinación está involucrada en un evento temprano o tardío de la infección viral.

Investigar el efecto de la inhibición de la ubiquitinación en la infectividad del astrovirus VA1.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Células, virus y reactivos

Las células C2Bbe1 son clones de una línea celular derivada de cáncer de colon humano Caco-2, las cuales se obtuvieron a través de una compra en *American Type Culture Collection* y se propagaron en un medio Dulbecco's modified Eagle's medium-High glucose (DMEM-HG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Cat. D7777-10X1L), suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA Cat. 1140) y 10% de suero fetal bovino (Cansera, Ontario, Canadá), conservando una atmósfera de 10% de CO₂ y una temperatura constante de 37°C. El medio MEM (Minimum Essential Medium) fue usado para realizar lavados y fue comprado a Invitrogen (Cat. 31985070). El astrovirus VA1 fue donado por el laboratorio del Departamento de Patología e Inmunología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington en Saint Louis, Missouri, por el Dr. David Wang.

El anticuerpo monoclonal anti-tubulina (clonaTU-01) fue comprado a Invitrogen (Cat. 138000), el anticuerpo secundario acoplado a Alexa-647 fue comprado a invitrogen (Cat. A21245). Previamente, se produjeron anticuerpos contra VA1 en el laboratorio, como es el anticuerpo monoclonal 2A2, hecho en ratón y dirigido contra la partícula viral completa de VA1 (Janowski, et al., 2021), así como el anticuerpo anti-proteasa dirigido a la proteasa viral (Jiménez, 2021) y el anticuerpo DuBois contra una proteína recombinante producida en bacteria equivalente a core de VA1 (Aguilera-Flores, et. al, 2022), estos últimos hechos en conejo. Por último, el inhibidor de la ubiquitinación Pyr41 (Cat. 662105) se adquirió de Calbiochem.

6.2 Infección y tratamiento con Pyr-41

Se sembraron células en placas de 96 pozos en un volumen de 150 µl de medio DMEM-HG. Una vez que llegaron a confluencia se infectaron con VA1 en una multiplicidad de infección (MOI) de 10, en un volumen de 50 µl durante una hora a 37°C. Posteriormente se retiró el virus no unido a las células con tres lavados con 100 µl de medio MEM. Las células se incubaron a 37°C por 24 horas con 150 µl de medio DMEM-HG suplementado con aminoácidos no esenciales. Para el tratamiento con Pyr-41, se agregó Pyr-41 a una concentración determinada (50µM, 100µM, 150µM, 200µM) y para el control se agregó DMSO a las mismas concentraciones. Para determinar en qué etapa actúa la ubiquitinación, se agregó 100 µM de Pyr-41 en diferentes tiempos.

Pasadas las 24 horas de incubación, se procesaron las células para determinar la progenie viral, la producción de proteínas virales y la viabilidad celular.

6.3 Determinación de la progenie viral

Se lisaron las células con tres ciclos de congelamiento/descongelamiento. Posteriormente, se determinó el título viral del virus presente en el lisado, titulándolo mediante ensayos de focos infecciosos por inmunoperoxidasa. En este ensayo se sembraron células en placas de 96 pozos y se infectaron con 50 µl virus proveniente del lisado en diluciones seriadas, empezando con una dilución 1:10 y haciendo diluciones dobles seriadas. Las células se incubaron por una hora a 37°C, se lavaron tres veces con 100 µl de medio MEM y se volvieron a incubar por 24 h a 37°C con 150 µl de medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales.

Para fijar la monocapa de células se retiró el medio y se agregó a cada pozo 100 µl de formaldehído al 2% diluido en PBS 1X, se dejó reposar por 20 minutos y se realizaron tres lavados con 100 µl de PBS 1X. Para permeabilizar las células y permitir la entrada de anticuerpos, se agregaron 100 µl de tritón al 0.2%, en cada pozo durante 15 minutos y se procedió a lavar tres veces con PBS 1X. Las células se incubaron con 50 µl del anticuerpo primario MAb2A2 (el cual es un anticuerpo monoclonal generado en nuestro laboratorio) diluido 1:1000 en PBS 1X durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubaron las células con 50 µl de proteína A conjugada con peroxidasa diluida 1:3000 en PBS 1X, durante 1 hora a 37°C. Para terminar, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se agregaron 50 µl del sustrato de la peroxidasa, 3-amino-9etil-carbazole (Sigma Chemicals) como se ha descrito previamente y se incubó a temperatura ambiente durante unos minutos hasta que las células se tiñeron de rojo. Las células se lavaron con agua y se dejaron secando para el posterior conteo de focos.

Para obtener el título del lisado viral, se tomó la dilución donde contaron de 150 a 300 focos o células teñidas y se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral} = \left(\frac{(A \times A1) + (B \times B1)}{2} \right) \times 5.5 \times 20$$

Donde A y B representan los focos que se cuentan en cada dilución y A1 y B1 los factores de dilución de donde se contaron los focos.

6.4 Determinación de la producción de proteínas virales

La producción y el procesamiento de proteínas virales se determinó por Western blot; se lisaron las células previamente infectadas en placas de 96 pozos. Para llevar a cabo esta lisis, se añadió 50 µl de buffer de Laemmli 1X (Tris-Cl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10% y β-mercaptoetanol 1%) por pozo, se recolectó el buffer en microtubos y se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) al 12.5% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA) durante 1 hora a 130 mA

en buffer de transferencia (CAPS 10 mM, pH 11). Posteriormente, se bloquearon las membranas con PBS 1X con 0.1% de Tween-20 y 5% de leche descremada (Carnation) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se desechó la leche y se lavó el exceso con PBS 1X con 0.1% de Tween-20. Después se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en PBS-Tween-20 al 0.1% durante toda la noche 4°C. Se hicieron tres lavados, cada uno de 10 minutos con PBS-Tween-20 al 0.1% y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 647, diluido 1:1000 en PBS1X-0.1% Tween-20 durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS1X-0.1% Tween-20 y se detectó la señal en un escáner Typhoon™ FLA 9500 (GE Healthcare).

La señal de cada banda fue capturada a través del programa Thyphoon™ FLA 9500 y se cuantificó la producción de proteínas con el programa ImageQuant TL 1D v8.1. Para determinar la producción de proteínas virales se capturaron los datos obtenidos en ImageQuant TL1D v8.1 de cada carril de la membrana, el dato obtenido por cada banda se dividió entre el dato obtenido del control de carga, en el caso de las proteínas no estructurales se usó como control de carga una banda inespecífica que se detecta con el anti-proteasa, mientras que para las proteínas estructurales se hizo uso de anti-tubulina para detectar una banda de tubulina como control de carga.

Para calcular el porcentaje de proteínas sintetizadas durante la inhibición con respecto al control, se dividió la cantidad de proteína viral obtenida en el tratamiento de Pyr-41 entre la cantidad de proteína viral obtenida con el control de DMSO y se multiplicó por 100.

6.5 Determinación de la viabilidad celular

Para determinar si las células son viables a diferentes concentraciones de Pyr.41, se realizó un ensayo de liberación de LDH. Para iniciar, se recuperó el medio de células previamente infectadas en placas dilutoras y éstas se lisaron añadiendo 50 µl de la solución de lisis (número de catálogo L2152; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluida 1:10 en DMEM sin suero, y se incubó por 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo, se colectaron los lisados en placas dilutoras. Para realizar el ensayo, se tomaron 50 µl de cada sobrenadante y 50 µl de las células lisadas previamente diluidas 1:5 en medio DMEM sin suero y añadieron 50 µl de medio DMEM sin suero a tres pozos que servirían de blanco. A cada muestra y a los blancos se le adicionaron 50 µl del mix del ensayo de LDH, la cual se compone de volúmenes iguales de la solución sustrato (número de catálogo L2402; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), la solución colorante (número de catálogo L2277; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y de la preparación 1X del cofactor. Se dejaron incubar a temperatura ambiente de 20 a 30 minutos en ausencia de luz y se detuvo la reacción agregando un volumen de 1/10 de HCl 1N a cada pozo. Posteriormente se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 490 nm, para eliminar

el fondo se mide la absorbancia a 690 nm y se le resta al valor obtenido en la lectura a 490 nm.

Para calcular el porcentaje de LDH total se utilizó la siguiente fórmula:

$$LDH_{total} = (LDH \text{ del lisado} \times 5) + LDH \text{ en sobrenadante}$$

Y para calcular el LDH liberado al medio, se hizo uso de la fórmula:

$$LDH_{libre} = (LDH \text{ en sobrenadante} / LDH_{total}) (100)$$

6.6 Determinación de la infectividad

Para determinar la infectividad, se infectaron células C2Bbe1 a una MOI de 0.02 en una placa de 96 pozos y se adicionó Pyr-41 a diferentes tiempos de la infección. Después de 24 horas de incubación, se fijaron y permeabilizaron las células con 100 µl de formaldehído y tritón, respectivamente. Posteriormente se incubaron con 50 µl del anticuerpo primario mAb2A2 diluido 1:1000 en PBS 1X durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubaron las células con 50 µl de proteína A conjugada con peroxidasa diluida 1:3000 en PBS 1X, durante 1 hora a 37°C.

Para calcular el % de infectividad con respecto al control, se realizó una relación donde el control era igual a 100%.

6.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este trabajo se graficaron con el programa GraphPad Prism, graficando la media aritmética y desviación estándar (SD) de cada experimento. Para decidir si hay diferencias estadísticas entre un tratamiento y el control se tomó como base un P-value menor a 0.05, con una prueba Mann-Whitney.

7. RESULTADOS

La ubiquitinación es necesaria para la replicación de VA1

Los astrovirus clásicos requieren del Sistema Ubiquitina-Proteosoma en el ciclo replicativo. Al inhibir la ubiquitinación por diferentes estrategias se ha observado una reducción de la progenie viral en Yuc-8 (Casorla-Pérez, et al., 2018).

Para determinar si la ubiquitinación también es necesaria en la replicación de VA1, se infectaron células C2Bbe1 con VA1 y se incubaron con diferentes concentraciones de Pyr-41, un inhibidor de la enzima activadora E1; posteriormente se analizó la producción de progenie viral por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa. Como se observa en la Figura 8A, la producción de progenie viral se redujo en respuesta a la dosis del fármaco, sin presentar una toxicidad para las células en las concentraciones de 100 μM y 150 μM (Fig. 8B), donde la liberación de LDH no fue significativamente mayor que el tratamiento control con DMSO.

Cuando se trataron a las células infectadas a una concentración de 50 μM de Pyr-41 no se observó un cambio significativo en la producción de progenie viral con respecto al control de DMSO. A una concentración de 100 μM de Pyr-41, la producción de progenie viral disminuyó cerca de medio logaritmo con respecto al control y un logaritmo a una concentración de 200 μM (Fig. 8A), la disminución de la progenie fue dependiente a la dosis.

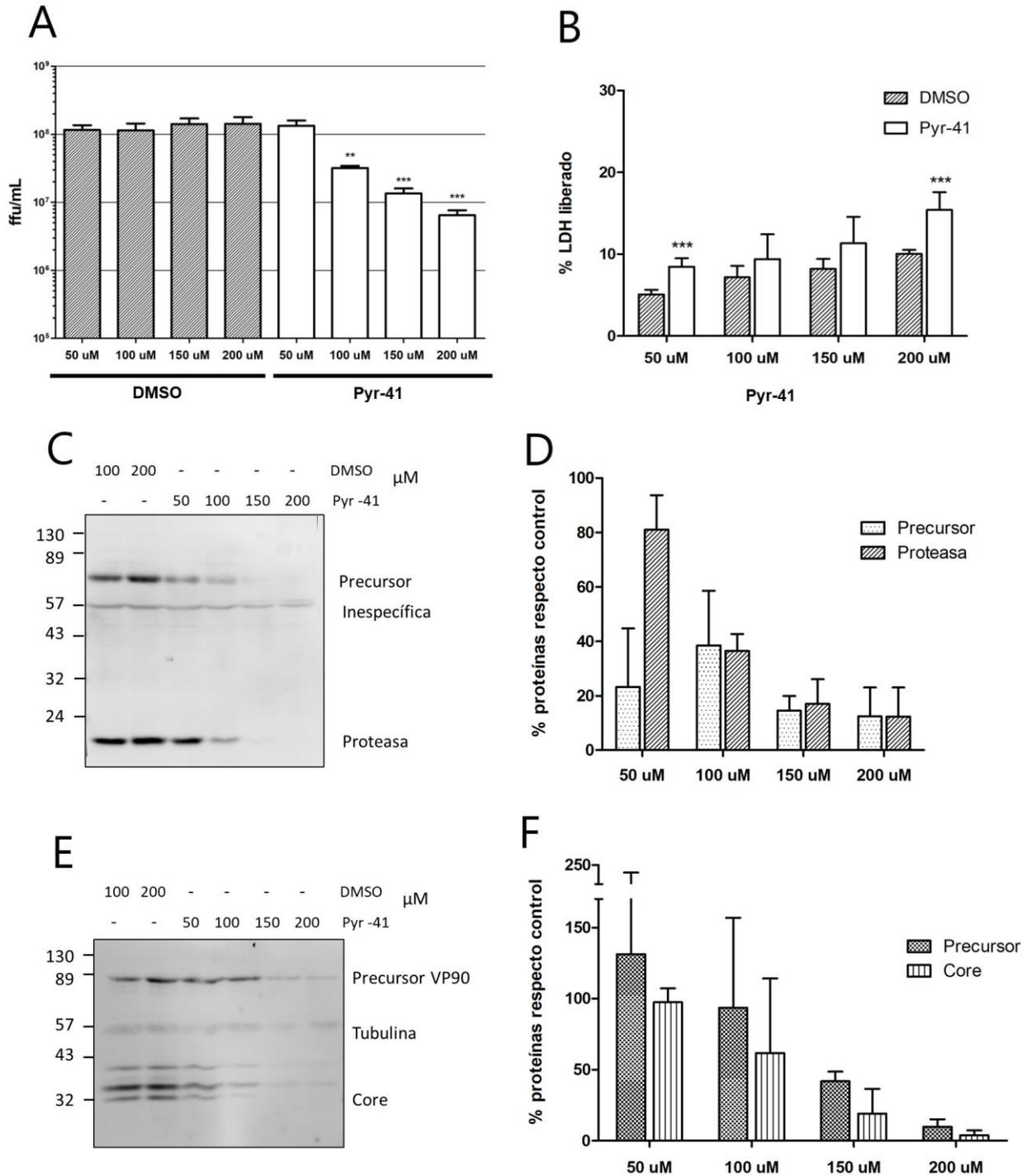


Figura 8. La inhibición de la ubiquitinación reduce la producción de progenie y síntesis de proteínas. Las células C3Bbe1 se infectaron con una MOI de 10 de VA1. A) Producción de progenie viral en células tratadas con las concentraciones indicadas de Pyr-41, como control de cada muestra se usó DMSO a 0.1%, 0.2%, 0.3 % y 0.4%, correspondientemente. B) Ensayo de liberación de LDH en el medio extracelular, control de citotoxicidad de Pyr-41. (C-F) Análisis de Western blot de las proteínas estructurales y no estructurales de VA1 a diferentes concentraciones de Pyr-41. C) Producción de la proteasa de VA1. D) Análisis cuantitativo de tres experimentos de la

producción de proteasa de VA1. E) Producción de las proteínas estructurales de VA1 F) Análisis cuantitativo de dos experimentos de la producción del core de VA1.

Para determinar si Pyr-41 también afecta en la producción de proteínas virales de VA1, se infectaron células C2Bbe1 con VA1 y se incubaron con diferentes concentraciones de Pyr-41, posterior a las 24 horas de infección, se recogieron las células con buffer de Leammli y se analizaron las muestras por medio de un Western blot.

Al inhibir la ubiquitinación en la infección por el astrovirus VA1, se observó una disminución en la expresión de las proteínas no estructurales (Fig. 8C-D) y en las proteínas estructurales (Fig. 8E-F), la producción de ambas proteínas disminuye conforme aumenta la dosis de Pyr-41. Esto nos sugiere que la ubiquitinación es necesaria para la expresión de las proteínas virales de VA1,

En la figura 8C se observa que la expresión de la proteína precursora de la proteasa se reduce cuando las células son tratadas con 50 μM de Pyr-41. La expresión del precursor y la proteasa se ve afectada por igual cuando se trata a las células con 100 μM de Pyr-41, y la expresión de esta es nula después de agregar una dosis mayor de 150 μM .

La expresión de la proteína precursora VP90 no se ve afectada con una dosis de 50 μM , pero sí las proteínas maduras. Esta disminución de la expresión de las proteínas estructurales va aumentando conforme a la dosis, pero la expresión no es nula a la dosis más alta de 200 μM (Fig. 8E-F). Lo anterior sugiere que la ubiquitinación se requiere para la expresión de la proteína estructural, pero no para el procesamiento.

Para los siguientes experimentos, se seleccionó una dosis constante, la cual debía causar efecto en la producción de proteínas y progenie virales sin causar un daño en las células. Para ello, se repitieron los experimentos anteriores en una sola concentración, la cual fue 100 μM . En la repetición de estos experimentos se observó que la inhibición de ubiquitinación disminuía seis veces la producción de progenie viral (Fig. 9A), pero la liberación de LDH aumentó con respecto al control en estas repeticiones, representando una toxicidad significativa en las células (Fig. 9B).

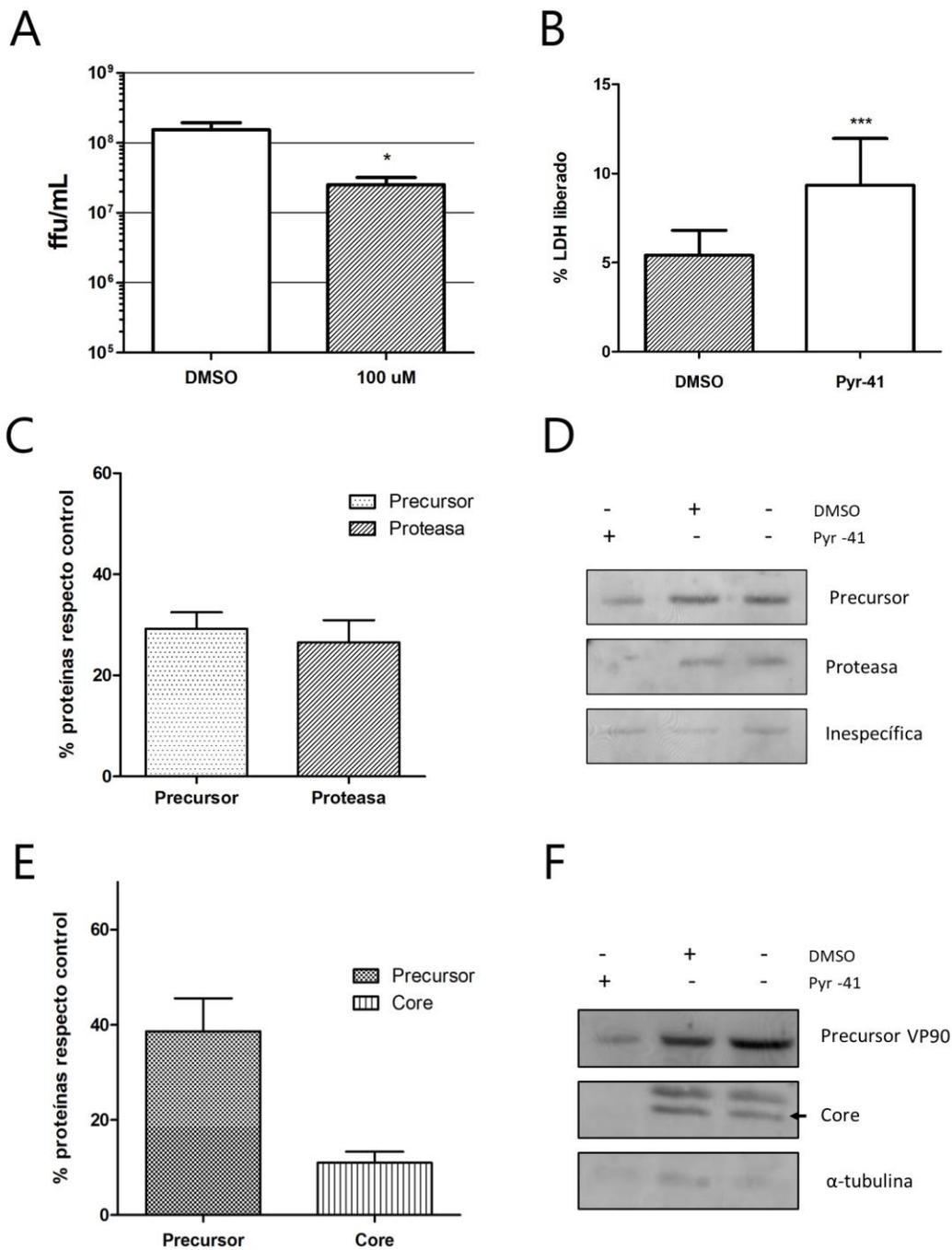


Figura 9. La expresión de proteínas virales y la producción de progenie virales se reducen significativamente a una dosis de 100 μ M de Pyr-41 (el control es DMSO 0.2%). A) Titulación de la progenie viral sometida a 100 μ M de Pyr-41. B) Ensayo de liberación de LDH en el medio extracelular, control de citotoxicidad de Pyr-41. (C-F) Análisis de Western blot de las proteínas estructurales y no estructurales de VA1 a diferentes concentraciones de Pyr-41. C) Producción de la proteasa de VA1. D) Análisis cuantitativo de seis experimentos de la producción de proteasa de VA1. E) Producción de las proteínas estructurales de VA1 F) Análisis cuantitativo de cinco experimentos de la producción del core de VA1.

Posteriormente se analizó la síntesis de proteínas virales en células infectadas que fueron tratadas con 100 μ M de Pyr-41. Para ello, se repitió el análisis de Western blot, donde se observó que la proteína precursora de la proteasa disminuye 29.26% con respecto al control, mientras que la proteasa madura disminuye 23.12% (Fig. 9C-D). Con respecto a las proteínas estructurales, el precursor VP90 disminuye 38.63% en presencia de Pyr-4, mientras que la producción del *core* disminuyó 11.01% con respecto al control (Fig. 9E-F).

VA1 requiere de ubiquitinación en una etapa temprana de la infección

Tanto en los astrovirus clásicos, como en VA1, se tienen reportes de la importancia del proteosoma en las etapas tempranas del ciclo replicativo del virus. La inhibición de la actividad del proteosoma con fármacos como MG132, disminuye la producción de progenie viral cuando la droga se administra en las primeras horas post-infección (hpi) (Casorla-Pérez, et al., 2018; Jiménez, 2021).

Para determinar si la ubiquitinación participa en un evento temprano o tardío de la replicación viral de VA1, se infectaron células C2Bbe1 con VA1 a una MOI de 10. En este diseño experimental se adicionó Pyr-41 a diferentes horas de infección (Fig.10A), en una concentración de 100 μ M, iniciando con un pre-tratamiento, donde se agregó la droga una hora previa a la infección.

La progenie viral de VA1 disminuyó un logaritmo respecto al control, cuando se pretrataron a las células una hora antes de la infección, pero el efecto de la droga fue mayor cuando se adicionó nuevamente después de la hora de absorción (Fig.10B). Se observó una mayor disminución de la progenie viral cuando se adicionó Pyr-41 durante y después de la hora de absorción, disminuyendo 2.6 logaritmos con respecto al control.

La inhibición de la ubiquitinación no afectó en la producción de progenie viral cuando se adicionó Pyr-41 a las 3 hpi, ni en tiempos posteriores, demostrando que la ubiquitinación es necesaria en las etapas tempranas de la infección de VA1.

Para determinar el papel de la ubiquitinación en la producción de proteínas, se infectaron células C2Bbe1 con VA1 a una MOI de 10, se incubaron con Pyr-41 a 100 μ M a diferentes horas de infección. Pasadas las 24 horas de infección, se recogieron las células con buffer de Laemmli y se analizaron las muestras por medio de un Western blot.

La síntesis de proteínas virales disminuyó ante la adición de Pyr-41 en las primeras horas de infección, lo que concuerda con la producción de progenie viral. En la figura 10C se observa que la expresión de la proteína precursora de la proteasa se ve afectada con el pretratamiento con Pyr-41 y su expresión es casi nula cuando se inhibe la ubiquitinación durante la absorción del virus. Este efecto de reducción también se observa en la expresión de proteasa madura, pero en

menor escala. La producción de proteasa ya no se ve afectada cuando Pyr-41 se adiciona a las 3 hpi.

La producción de proteínas estructurales se ven afectadas indistintamente. Con el pretratamiento de Pyr-41 se ve una disminución en la expresión del precursor VP90 y de las proteínas estructurales maduras, y cuando se añade Pyr-41 después de la infección, la expresión de estas proteínas es menor. Como en los experimentos anteriores, Pyr-41 pierde efecto cuando es añadido después de las 3 hpi (Fig.10D).

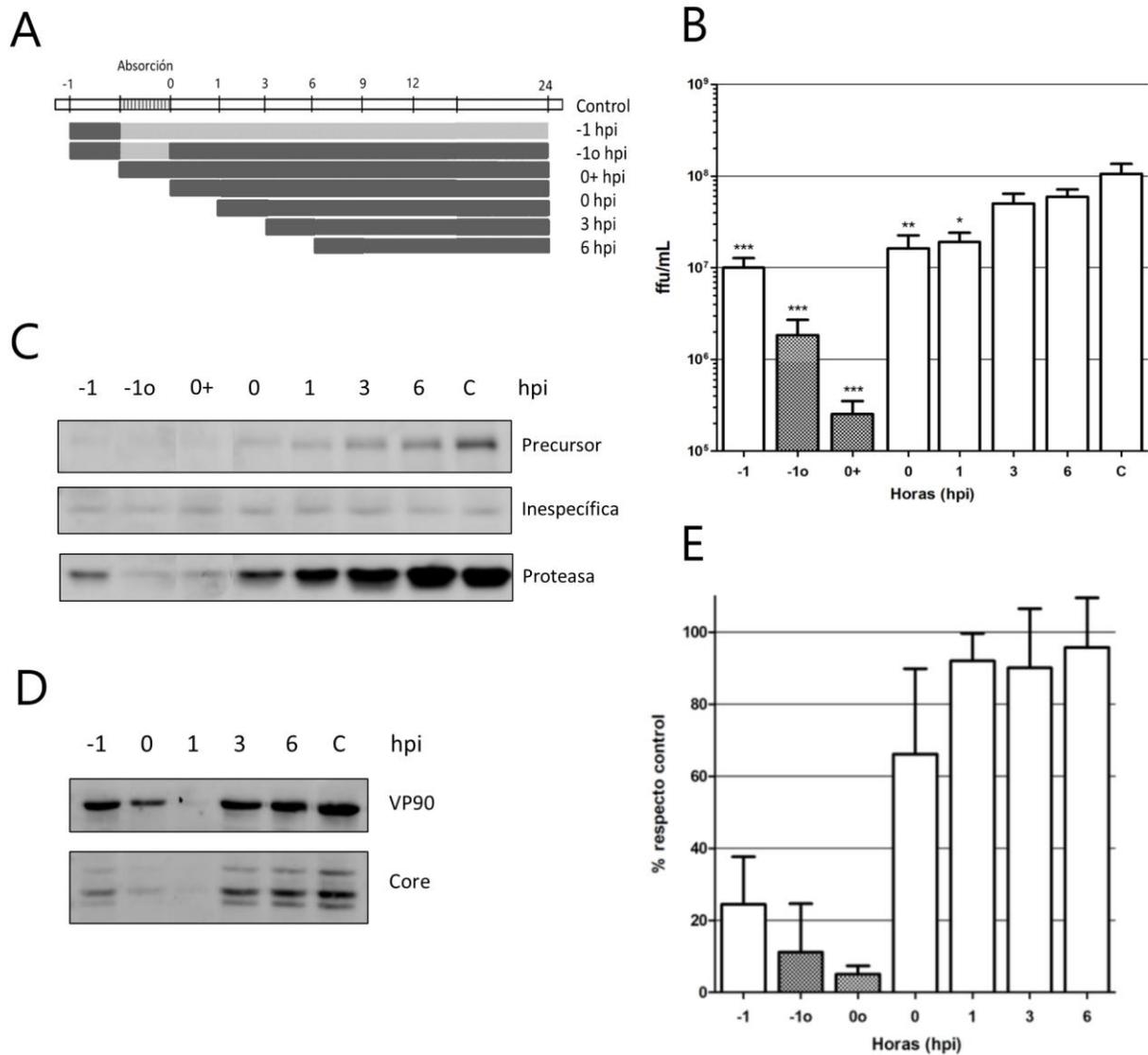


Figura 10. La inhibición de la ubiquitinación afecta a la infección de VA1 en etapas tempranas. A) Esquema del diseño experimental de la cinética de infección, la barra gris oscuro indica la presencia de Pyr-41 y la barra gris claro la ausencia de Pyr-41 durante la infección. El fármaco se adicionó una hora antes de la absorción, durante la absorción, después de la absorción y una, dos y tres horas después de la absorción, los primero dos tiempos se realizaron dos repeticiones donde se vuelva a adicionar o no la droga después de la absorción Todos los lisados se recolectaron a las 24 hpi. B) Producción de la progenie viral de VA1, inhibiendo la ubiquitinación a diferentes tiempos durante la infección C) Análisis de Western blot de las proteínas estructurales y D) no estructurales, añadiendo Pyr-41 en diferentes tiempos de la infección. E) Ensayo de infectividad, MOI de 0.02.

Pyr-41 afecta la infectividad de VA1

La disminución de progenie viral y la producción de proteínas virales ante el tratamiento de Pyr-41 nos demuestra que la ubiquitinación es necesaria en el ciclo viral de VA1. Con esta información no podemos determinar si la ubiquitinación ocurre a nivel de entrada o en un evento posterior a la entrada, ya que esta disminución sería igual si el virus no entrara, si no se tradujeran sus proteínas o si no se transcribe o replica el genoma. Por ello, se realizó un ensayo de infectividad, donde es posible descartar si la ubiquitinación está involucrada en la entrada o no, ya que nos muestra la cantidad de virus que está entrando aunque este produzca una menor cantidad de proteínas.

Para investigar el efecto de la inhibición de ubiquitinación en la infectividad de VA1, se infectaron células C3Bbe1 a una MOI de 0.02 y se trataron con Pyr-41 a las mismas horas, pasadas las 24 horas de incubación se realizó un ensayo de inmunoperoxidasa y se calculó el porcentaje de infectividad respecto al control.

El pretratamiento con Pyr-41 disminuyó la infectividad de VA1 al 24.66% respecto al control; al adicionar nuevamente la droga, la infectividad disminuyó al 11.15%. La infectividad de VA1 disminuyó hasta el 5.08% al adicionar Pyr-41 durante la absorción de virus, mientras que al agregar la droga después de la absorción la infectividad disminuyó al 66.18%. Las horas posteriores a la infección no tuvieron un efecto mayor en la infectividad, ya que todas representan más del 90% de infectividad (Fig.10E).

Pyr-41 afecta la infectividad de VA1 en etapas muy tempranas, pero después de la primera hora de infección no muestra un efecto. Esto nos indica que la ubiquitinación es esencial para la infectividad de VA1 en las primeras etapas de infección.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que la inhibición de ubiquitinación resulta en la disminución de la producción de progenie viral y la síntesis de proteínas virales del astrovirus neurotrópico VA1. En estudios previos, se observó que la cepa Yuc-8 del HAstV-1 requiere de ubiquitinación en su ciclo replicativo, probablemente para la degradación de proteínas vía el sistema ubiquitina-proteosoma. Sin embargo, estos hallazgos no pueden descartar el papel de la ubiquitinación independiente a la degradación en el ciclo viral de HAstV-8 (Casorla-Pérez, et al., 2018).

Los mismo ocurre en el caso de VA1, con los resultados reportados hasta el momento no se puede determinar si la replicación de VA1 requiere de una degradación mediada por el proteosoma dependiente de la ubiquitinación, ya que se sabe que la inhibición del proteosoma afecta la producción de progenie y la expresión de proteínas virales, pero esto es un evento independiente de inhibir la ubiquitinación.

Para iniciar la infección, el virus debe reconocer un receptor celular localizado en la superficie de la membrana. Astrovirus entra a las células por endocitosis mediada por clatrina y llega hasta endosomas tardíos. El virus debe llegar al citoplasma, donde libera su genoma para producir nuevas partículas virales. Desde que el virus se internaliza a las células hasta que se libera el genoma viral pasan cerca de 130 minutos en los virus clásicos (Méndez, et al., 2014), pero este tiempo de descapsidación aún no está registrado para VA1. Se sugiere que VA1 posee una curva de crecimiento similar a los astrovirus clásicos, sin embargo, está retrasada en las etapas tempranas de infección (Aguilera-Flores, 2020).

La fase de eclipse de HAstV-8 tiene una duración de 7 horas (Baños & Méndez, 2010), mientras que VA1 muestra un retraso de 5 horas (Aguilera, 2020). Se le denomina fase de eclipse al periodo previo al ensamble viral, es decir, desde la internalización hasta la aparición de partículas intracelulares infectivas. Entonces, a VA1 le toma 12 horas para producir partículas infecciosas desde que entra a las células, pero se desconoce en qué paso ocurre este retraso.

En este trabajo también se demostró que VA1 requiere de ubiquitina en etapas tempranas de la infección, cuando se inhibe la ubiquitinación a las 3 hpi no se observa un efecto significativo en la producción de progenie viral, mientras que la infectividad no se ve afectada cuando se inhibe la ubiquitinación a la 1 hpi o después de esta. Este efecto en etapas tan tempranas de la infección nos indica que la ubiquitinación es esencial en un paso muy temprano, como podría ser la entrada de VA1 a la célula, ya sea la internalización del virus a la célula o la pérdida de la cápside.

Sin embargo, no se puede concluir que la ubiquitinación es necesaria para la entrada. Es posible que algún proceso posterior a la entrada como es la traducción del RNA viral, la formación del complejo de replicación para la síntesis del agRNA o el inicio de la transcripción se afecten de forma irreversible al inicio del ciclo.

Para determinar si la ubiquitinación está involucrada en la entrada de VA1, es necesario realizar una transfección de RNA viral en células C2Bbe1 y adicionar Pyr-41 a las mismas horas de infección utilizadas (Fig 10^a). Si la ubiquitinación está involucrada en un proceso de entrada del virus, la inhibición por Pyr-41 no tendrá efecto en la producción de virus ni en la infectividad, ya que con la transfección se saltaría la entrada y la ausencia de ubiquitinación sería irrelevante.

Si la ubiquitinación se requiere para la entrada de VA1, una posibilidad es que alguna de las proteínas de la cápside requiera ser ubiquitinada como parte del proceso de entrada. Para determinar si la ubiquitinación está ocurriendo en las proteínas de la cápside de VA1, se deberá analizar durante la entrada del virus esta posibilidad. Para esto, se podría transfectar un plásmido que exprese ubiquitina marcada con una etiqueta como HA, posteriormente infectar con el virus y observar si existe ubiquitinación por medio de una inmunoprecipitación. De ser este el caso al inmunoprecipitar al virus será posible detectar en el Western blot la presencia de ubiquitina (utilizando como anticuerpo de detección uno contra la etiqueta). Al querer profundizar qué tipo de ubiquitinación podría estar ocurriendo, se podría transfectar un plásmido que exprese ubiquitina que contenga únicamente la lisina 48 (ubiquitin K48 only) o la lisina K63 (ubiquitin K63 only), que corresponden a la degradación y señalización, respectivamente.

Los virus se caracterizan por secuestrar la maquinaria celular del huésped para la producción de nuevas partículas virales. Por ello, múltiples virus utilizan el proceso de ubiquitinación para su propio beneficio, la cual puede estar involucrada en las diferentes etapas de la infección.

La ubiquitinación puede estar involucrada en las primeras etapas de la infección como la internalización a la células y el desnudamiento del virus (Fig. 11). Algunos virus utilizan la ubiquitinación para regular la entrada por endocitosis, un claro ejemplo es el virus del dengue (Gu H., & Jan Fada, 2020).

El virus del dengue (DENV) usa al receptor de fosfatidilserina (TIM-1) como receptor, el cual da lugar a la entrada del virus por medio de endocitosis. Para que DENV se internalice a las células se une a TIM-1 y juntos se internalizan por medio de endocitosis mediada por clatrina, para que esto ocurra es necesaria la ubiquitinación de dos residuos de lisina en el dominio citoplasmático de TIM-1 (Dejarnac, et al., 2018).

En la descapsidación o el desnudamiento, que se refiere a la liberación del genoma de la cápside, la ubiquitinación juega un papel, puesto que se ha asociado a la degradación dependiente del proteosoma, con el objetivo de eliminar

total o parcialmente la cápside para que el material genético sea liberado (Gu H., & Jan Fada, 2020).

La ubiquitinación posee un papel importante en la entrada del virus de la Influenza tipo A (IAV), específicamente en el desnudamiento del virus (Fig. 11). Se ha demostrado que la ligasa de ubiquitina E3 (ITCH) promueve la liberación de IAV a través de la ubiquitinación de la proteína de matriz del virus (M1). Posterior a la fusión, los restos de ubiquitina anclados a M1 son expuestos al citoplasma y atraen a la enzima citoplasmática HDAC6, la cual se une a la cápside, que se ha descompuesto en dímeros M1 durante el tránsito endocítico. Esta unión permite que se desensamble la cápside por la fuerza de corte de los motores del citoesqueleto, liberando M1 hacia el citosol (Banerjee, et al., 2014).

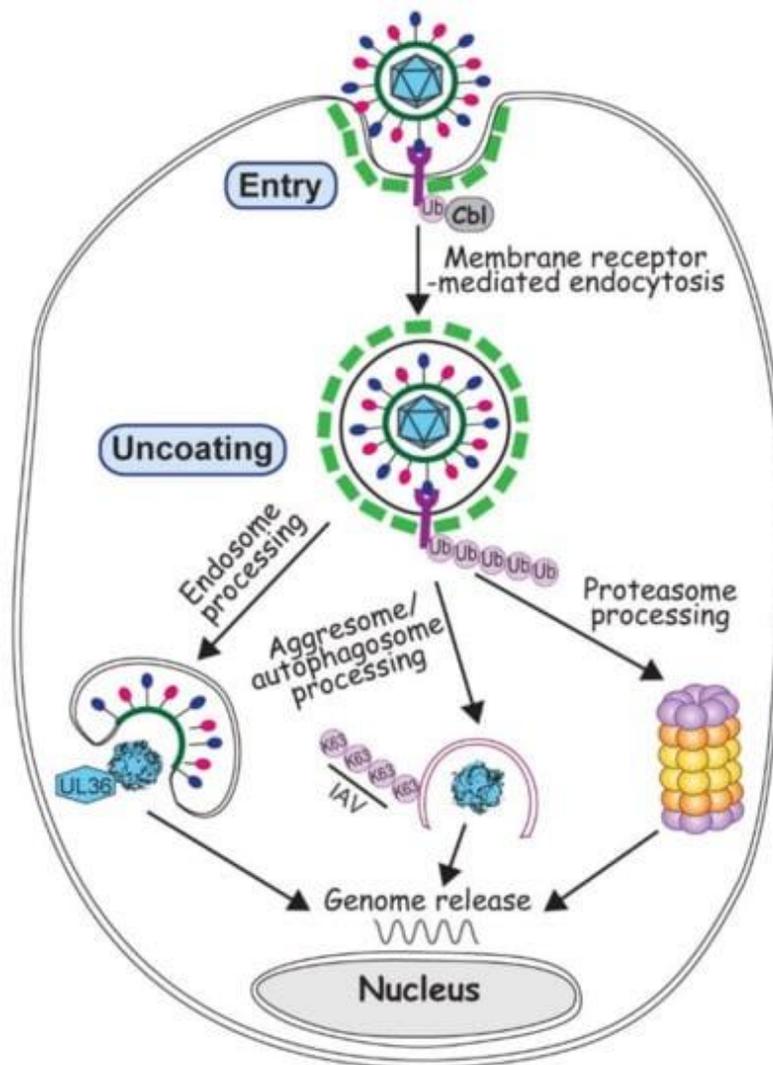


Figura 11. Papel de la ubiquitinación en la entrada de virus. La ubiquitinación del receptor promueve la entrada de virus a través de endocitosis. Una vez dentro, los virus pueden emplear endosomas, autofagosomas o proteasomas para procesar el virión y liberar el genoma viral, los cuales son dependientes de ubiquitina. (Gu, H., & Jan Fada, 2020).

IAV usa esta estrategia cerca del centro organizador de microtúbulos (MTOC), ya que induce una red estable de microtúbulos que promueva el transporte de las ribonucleoproteínas virales (vRNP) al núcleo, donde se llevará a cabo el ciclo replicativo del virus, ya que IAV es un virus de ssRNA que requiere llevar su material genético al núcleo.

En el caso de VA1, este no requiere transportar su material genético al núcleo, al ser un virus de ssRNA se puede replicar en el citoplasma. Por lo tanto, parecería menos probable compartir la estrategia de descapsidación del virus de la influenza, pero con los datos mostrados en este trabajo podemos hipotetizar que VA1 requiere de ubiquitinación para endocitarse a las células, con un mecanismo parecido al del virus del dengue.

Pyr-41 no es el único inhibidor de la ubiquitinación reportado por lo que sería importante utilizar otros inhibidores como TAK-243 (Hyer, et al., 2018) o JS-K (Kitagaki, et al., 2009) o el silenciamiento de los genes de ubiquitina por medio de siRNA. Ya que Pyr-41 no es un inhibidor muy específico, se ha registrado que es capaz de también inhibir desubiquitininas y esto podría causar un sesgo en los resultados (Kapuria, et al., 2011), ya que como se puede ver en las figuras 8B y 9B, Pyr-41 puede causar un efecto citotóxico en concentraciones bajas.

En caso de que la replicación de VA1 no se vea afectada por otros fármacos o por el silenciamiento de *ubc*, se podría considerar que el virus requiere de desubiquitininas durante su ciclo replicativo, ya que existen registros de virus que usan esta vía como el virus de la pseudorrabia (PrV) (Böttcher, et al, 2008).

El PrV es un herpesvirus neuroinvasivo que posee una proteasa específica de ubiquitina que se encuentra contenida en la proteína tegumentaria (pUL36). Esta proteasa de ubiquitina pierde la actividad desubiquitinante al mutar una cisteína del sitio activo de pUL36. Al perder esta capacidad de desubiquitinación hay una disminución de la replicación viral de PrV, además de impedir la neuroinvasión en ratones (Böttcher, et al, 2008). Esto podría ser replicable en VA1 al ser un virus neurotrópico, pero no se ha registrado una proteína viral de VA1 con esta capacidad de desubiquitinar. Por lo tanto, se debería explorar el uso de drogas que inhiban la desubiquitinación .

El astrovirus neurotrópico VA-1 requiere de ubiquitinación durante su ciclo replicativo, aunque aún no queda claro en que etapa el ciclo actúa y que función tiene. Sin embargo, lo previamente expuesto en este trabajo ayudará a la búsqueda de fármacos antivirales que contrarresten la infección, ya que el virus es incapaz de replicarse en ausencia de ubiquitinación.

9. CONCLUSIONES

1. La inhibición de la ubiquitinación reduce la producción de progenie viral y la expresión de proteínas virales.
2. La inhibición de la ubiquitinación afecta principalmente una etapa temprana del ciclo replicativo
3. La inhibición de la ubiquitinación afecta la infectividad en etapas tempranas, pero no en etapas tardías de la infección.

10. PERSPECTIVAS

Determinar si el efecto de la inhibición de la ubiquitinación afecta la entrada del virus, por transfección de RNA viral.

Determinar el efecto del silenciamiento de ubiquitinación en el ciclo replicativo del virus, por medio de transfección de siRNA.

11. REFERENCIAS

- Aguilera-Flores, C., López, T., Zamudio, F., Sandoval-Jaime, C., Pérez, E. I., López, S., ... & Arias, C. F. (2022). The capsid precursor protein of astrovirus VA1 is proteolytically processed intracellularly. *Journal of Virology*, 96(14), e00665-22.
- Aguilera Flores, C. (2020). *Caracterización del crecimiento y del procesamiento de la proteína de la cápside del astrovirus neurotrópico VA1*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM: <http://132.248.9.195/ptd2023/enero/0835022/Index.html>
- Arias, C. F., & López, T. (2016). Astrovirus. *Clinical Virology*, 1231-1242.
- Arias, C. F., & DuBois, R. M. (2017). The astrovirus capsid: a review. *Viruses*, 9(1), 15.
- Bami, S., Hidinger, J., Madni, A., Hargest, V., Schultz-Cherry, S., Cortez, V., ... & Hijano, D. R. (2022). Human Astrovirus VA1 Encephalitis in Pediatric Patients With Cancer: Report of 2 Cases and Review of the Literature. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*.
- Banerjee, I., Miyake, Y., Nobs, S. P., Schneider, C., Horvath, P., Kopf, M., ... & Yamauchi, Y. (2014). Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. *Science*, 346(6208), 473-477.
- Baños-Lara, del Rocío M., & Méndez, E. (2010). Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology*, 401(2), 322-332.
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2014). Human astroviruses. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 1048-1074.
- Böttcher, S., Maresch, C., Granzow, H., Klupp, B. G., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2008). Mutagenesis of the active-site cysteine in the ubiquitin-specific protease contained in large tegument protein pUL36 of pseudorabies virus impairs viral replication in vitro and neuroinvasion in vivo. *Journal of virology*, 82(12), 6009-6016.
- Casorla-Perez, L. A., Lopez, T., Lopez, S., & Arias, C. F. (2018). The ubiquitin-proteasome system is necessary for efficient replication of human astrovirus. *Journal of virology*, 92(2), e01809-17.

- Curran, M. P., & McKeage, K. (2009). Bortezomib. *Drugs*, 69(7), 859-888.
- D'Arcy, P., Wang, X., & Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacology & therapeutics*, 147, 32-54.
- Dejarnac, O., Hafirassou, M. L., Chazal, M., Versapuech, M., Gaillard, J., Perera-Lecoin, M., ... & Amara, A. (2018). TIM-1 ubiquitination mediates dengue virus entry. *Cell reports*, 23(6), 1779-1793.
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., & Cattoli, G. (2011). Astrovirus infections in humans and animals—molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1529-1544.
- Dryden, K. A., Tihova, M., Nowotny, N., Matsui, S. M., Mendez, E., & Yeager, M. (2012). Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus. *Journal of molecular biology*, 422(5), 650-658.
- Finkbeiner, S. R., Li, Y., Ruone, S., Conrardy, C., Gregoricus, N., Toney, D., ... & Tong, S. (2009). Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *Journal of virology*, 83(20), 10836-10839.
- Fraile, J. M., Quesada, V., Rodríguez, D., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2012). Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*, 31(19), 2373-2388.
- Fuentes, C., Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2012). Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *Journal of virology*, 86(18), 10070-10078.
- Gao, G., & Luo, H. (2006). The ubiquitin–proteasome pathway in viral infections. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 84(1), 5-14.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968), 895-899.
- Goldberg, A. L. (2007). Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochemical Society Transactions*, 35(1), 12-17.

- Guo, N., & Peng, Z. (2013). MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 9(1), 6-11.
- Gu, H., & Jan Fada, B. (2020). Specificity in ubiquitination triggered by virus infection. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4088.
- Haga, K., Takai-Todaka, R., Kato, A., Nakanishi, A., & Katayama, K. (2022). Neonatal Fc receptor is a functional receptor for human astrovirus. *bioRxiv*.
- Hyer, M. L., Milhollen, M. A., Ciavarrri, J., Fleming, P., Traore, T., Sappal, D., ... & Bence, N. F. (2018). A small-molecule inhibitor of the ubiquitin activating enzyme for cancer treatment. *Nature medicine*, 24(2), 186-193.
- Lewis, T. L., & Matsui, S. M. (1995). An astrovirus frameshift signal induces ribosomal frameshifting in vitro. *Archives of virology*, 140, 1127-1135.
- Lulla, V., & Firth, A. E. (2020). A hidden gene in astroviruses encodes a viroporin. *Nature communications*, 11(1), 1-15.
- Maximova, O. A., Weller, M. L., Krogmann, T., Sturdevant, D. E., Ricklefs, S., Virtaneva, K., ... & Cohen, J. I. (2022). Imbalanced immune response and dysregulation of neural functions underline fatal opportunistic encephalitis caused by astrovirus. *bioRxiv*, 2022-08.
- Méndez, E., Muñoz-Yañez, C., Sánchez-San Martín, C., Aguirre-Crespo, G., Baños-Lara, M. D. R., Gutierrez, M., ... & López, S. (2014). Characterization of human astrovirus cell entry. *Journal of virology*, 88(5), 2452-2460.
- Méndez, E., Murillo, A., Velázquez, R., Burnham, A., & Arias, C. F. (2012). Replication cycle of astroviruses. In *Astrovirus research* (pp. 19-45). Springer, New York, NY.
- Méndez, E., Salas-Ocampo, M. E., Munguía, M. E., & Arias, C. F. (2003). Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *Journal of virology*, 77(21), 11378-11384.
- Méndez, E., Salas-Ocampo, E., & Arias, C. F. (2004). Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *Journal of virology*, 78(16), 8601-8608.
- Mitch, W. E., & Goldberg, A. L. (1996). Mechanisms of muscle wasting—the role of the ubiquitin–proteasome pathway. *New England journal of medicine*, 335(25), 1897-1905.

- Morreale, F. E., & Walden, H. (2016). Types of ubiquitin ligases. *Cell*, 165(1), 248-248.
- Janowski, A. B., Bauer, I. K., Holtz, L. R., & Wang, D. (2017). Propagation of astrovirus VA1, a neurotropic human astrovirus, in cell culture. *Journal of virology*, 91(19), e00740-17.
- Janowski, A. B. (2021). Beyond the gastrointestinal tract: the emerging and diverse tissue tropisms of astroviruses. *Viruses*, 13(5), 732.
- Janowski, A. B., Owen, M. C., Dudley, H., López, T., Espinosa, R., Elvin-Lewis, M., ... & Wang, D. (2021). High seropositivity rate of neutralizing antibodies to astrovirus VA1 in human populations. *Mosphere*, 6(5), 10-1128.
- Jiménez M. (2021) Papel del Sistema Ubiquitina-Proteosoma en el ciclo replicativo de astrovirus VA1. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. TESIUNAM: <http://132.248.9.195/ptd2021/noviembre/0820285/Index.html>]
- Johnson, C., Hargest, V., Cortez, V., Meliopoulos, V. A., & Schultz-Cherry, S. (2017). Astrovirus pathogenesis. *Viruses*, 9(1), 22.
- Kapuria, V., Peterson, L. F., Showalter, H. H., Kirchhoff, P. D., Talpaz, M., & Donato, N. J. (2011). Protein cross-linking as a novel mechanism of action of a ubiquitin-activating enzyme inhibitor with anti-tumor activity. *Biochemical pharmacology*, 82(4), 341-349.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), 937-953.
- Kitagaki, J., Yang, Y., Saavedra, J. E., Colburn, N. H., Keefer, L. K., & Perantoni, A. O. (2009). Nitric oxide prodrug JS-K inhibits ubiquitin E1 and kills tumor cells retaining wild-type p53. *Oncogene*, 28(4), 619-624.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb-prot095497.
- Radici, L., Bianchi, M., Crinelli, R., & Magnani, M. (2013). Ubiquitin C gene: structure, function, and transcriptional regulation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2013.
- Schneider, S. M., Lee, B. H., & Nicola, A. V. (2021). Viral entry and the ubiquitin-proteasome system. *Cellular Microbiology*, 23(2), e13276.

- Song, Y. Q., Wu, C., Wu, K. J., Han, Q. B., Miao, X. M., Ma, D. L., & Leung, C. H. (2021). Ubiquitination regulators discovered by virtual screening for the treatment of cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 665646.
- Swatek, K. N., & Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell research*, 26(4), 399-422.
- Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., ... & Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 137(1), 133-145.
- Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R. M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., ... & Weissman, A. M. (2007). Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer research*, 67(19), 9472-9481