

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“Evaluación de la activación de Receptores tipo RIG-I en
respuesta a la infección con el virus dengue”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Ing. ROBERTO RAMÍREZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

México D.F. Julio 2012

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Agradecimientos

- A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, No. Proyecto:
- Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, Iniciativa Creación Joven.
- A la academia de profesores del posgrado en Ciencias Genómicas, por su tolerancia y comprensión con respecto a la demora de ciertos documentos.
- A la Dra. Martha Yocupicio por permitirme tomar decisiones sobre el proyecto, por valorar mi opinión, y por sus enseñanzas.
- A Manuel Escalera por la asistencia técnica en el laboratorio.
- A la Dra. Rosa María del Angel y su equipo en CINVESTAV por las facilidades brindadas durante las horas de trabajo en su laboratorio.
- A Eduardo Carrillo por su ayuda durante las sesiones de microscopia confocal.
- A mis padres por su apoyo incondicional durante creación de este proyecto.
- A Jacqueline y Brenda por hacer mi estancia en el posgrado significativamente menos aburrida.
- A Rafael Murray y Juan Pablo dueñas por su camaradería y compañía.

Índice general

Resumen .	10
Introducción.	11
Epidemiología.	11
Ciclo infeccioso.	12
Manifestaciones clínicas.	12
Virus del dengue.	13
Replicación viral.	14
Respuesta inmune durante la infección con dengue.	15
Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs).	17
Dominios funcionales de los RLRs.	19
Reconocimiento de RNA.	19
Señalización por RLRs.	22
Antecedentes.	25
Justificación.	29
Hipótesis.	30
Objetivo general.	31
Objetivos particulares.	32
Materiales y métodos.	33
Virus e infección.	33
Plásmidos.	33

Transfección de los vectores RIG-I y ΔRIG-I en las líneas celulares.	33
RT-PCR en Tiempo Real.	34
Microscopía confocal.	34
Obtención de las diferentes regiones de las UTR's de DENV-2.	35
Transcripción <i>in vitro</i>.	36
Transfección de UTRs en las líneas celulares.	37
Inmunoprecipitación de RNA (RIP).	38
Resultados.	39
Sobreexpresión de RIG-I.	39
Efecto de RIG-I en la eficiencia de replicación viral.	42
Efecto de RIG-I sobre la expresión de IFN-β en respuesta a la infección con DENV-2.	46
Obtención de los productos de PCR de las UTRs de DENV-2 .	49
Transcripción <i>in vitro</i> de las UTRs de DENV-2.	51
Evaluación de la expresión de IFN-β en respuesta a la transfección de las UTR's del genoma de DENV-2.	52
Expresión de IFN-β en respuesta a la transfección de las UTRs.	54
Efecto de RIG-I sobre la replicación viral y la producción de IFN-β.	57
Expresión de IFN-β en células U937 transfectadas con las UTR's de DENV-2.	62
Evaluación la activación de RIG-I y MAVS en respuesta a la infección con DENV-2.	63
Discusión y Análisis de Resultados.	72
Conclusiones.	84
Literatura citada.	85

Índice de Figuras

Figura 1. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>.	11
Figura 2. Representación esquemática del genoma del virus DENV.	13
Figura 3. Infección con el virus dengue.	15
Figura 4. Vía de señalización del IFN-I.	16
Figura 5. Receptores de reconocimiento de patógenos.	18
Figura 6. Representación esquemática de los dominios funcionales de las proteínas de la familia RLR.	19
Figura 7. Modelo de activación de RLRs.	22
Figura 8. Señalización por RLRs.	24
Figura 9. Representación esquemática de la UTR 3' de HCV.	25
Figura 10. Activación de IRF-3 en respuesta a la infección.	26
Figura 11. Inhibición de la expresión de ISGs en respuesta a la infección con DENV-2.	27
Figura 12. Vectores de RIG-I.	34
Figura 13. Esquema de transfección de las diferentes regiones en células Huh-7.	37
Figura 14. Determinación de los niveles de expresión de RIG-I y ΔRIG-I mediante RT-PCR en punto final	40
Figura 15. Determinación de los niveles de expresión de RIG-I mediante qRT-PCR.	40
Figura 16. Inmunofluorescencia de células transfectadas los vectores pEF-flagRIG-I (RIG-I) ó pEF-flagΔRIG-I (ΔRIG-I).	41
Figura 17. Acumulación de RNA viral en células transfectadas a las 24 h post-infección.	42
Figura 18. Inmunodetección de la proteína E en células Huh-7 transfectadas nfectadas con DENV-2	43
Figura 19. Perfil de expresión de RIG-I en células Huh-7 mediante qRT-	44

PCR

Figura 20. Perfil de expresión de MDA5 en células Huh-7 mediante qRT-PCR.	45
Figura 21. Perfil de expresión de LGP2 en células Huh-7 transfectadas e infectadas con DENV-2	46
Figura 22. Expresión de IFN-β en células Huh-7 transfectadas e infectadas con el DENV-2	47
Figura 23. Perfil de expresión de RANTES en células Huh-7.	48
Figura 24. Delimitación de las diferentes regiones de las UTRs.	49
Figura 25. Obtención de las diferentes regiones de las UTRs del genoma de DENV-2.	50
Figura 26. Transcripción <i>in vitro</i> de las UTRs del genoma de DENV-2	51
Figura 27. Interacción de las UTRs del virus dengue en solución.	52
Figura 28. Detección de las UTRs del genoma de DENV-2 transfectadas en células Huh-7.	53
Figura 29. Expresión de IFN-β en células Huh-7 transfectadas con las diferentes regiones de las UTRs de DENV-2.	24
Figura 30. Expresión de IFN-β en células Huh-7 estimuladas con poly I:C.	55
Figura 31. Expresión de IFN-β en células HeLa estimuladas con distintos inductores.	56
Figura 32. Detección del genoma viral a las 24 h post-infección.	57
Figura 33. Inmunodetección de la proteína viral E en células U937 transfectadas e infectadas con DENV-2.	58
Figura 34. Expresión de IFN-β en células U937 transfectadas e infectadas DENV-2.	59
Figura 35. Expresión de IFN-α en células U937 transfectadas e infectadas DENV-2.	60
Figura 36. Perfil de expresión de RLRs en células U937 infectadas con	61

Figura 37. Inducción de IFN-β por los diferentes fragmentos de las UTRs del genoma de DENV-2.	62
Figura 38. Inmunoprecipitación de RNA.	64
Figura 39. Distribución de MAVS en células Huh-7 infectadas con DENV-2	65
Figura 40. Distribución de MAVS en células U937 infectadas con DENV-2.	66
Figura 41. Distribución de RIG-I en células U937 infectadas con DENV-2.	68
Figura 42. Inmunodetección de IRF-3 en células Huh-7 infectadas con DENV-2 y VSV.	69
Figura 43. Inmunodetección de IRF-3 en células U937 infectadas con DENV-2 y VSV.	70
Figura 44. Redistribución de MAVS en fibroblastos de ratón infectados con el SeV.	74
Figura 45. Modelo de la redistribución de MAVS mediado por organización mitocondrial.	75
Figura 46. Productos inespecíficos de la transcripción <i>in vitro</i>.	79
Figura 47. Estructura molecular del ligando de RIG-I.	80

Resumen

La inmunidad innata se caracteriza por el uso de receptores de reconocimiento de patógenos, lo cuales reconocen componentes microbianos característicos. La familia de receptores tipo RIG-I (RLRs) se ha visto implicada en la inducción de interferon tipo I, en respuesta al reconocimiento citoplásmico de ácidos nucleicos virales. Dicha familia está formada por RIG-I, MDA5 y LGP2; de los cuales se ha mostrado que RIG-I y MDA5 poseen un reconocimiento diferencial de distintos virus. En este estudio se evaluó la activación de la vía de RLRs en respuesta a la infección con el virus dengue (DENV) en dos líneas celulares humanas que representan blancos naturales de la infección por dicho virus.

Nosotros encontramos que la inhibición de la actividad de RIG-I vuelve más permisivas las células a la infección por el virus de DENV. Por otra parte se observó que el DENV no induce o bloquea la inducción de IFN- β ; sin embargo, a pesar de esta inhibición se logró observar la redistribución de la proteína MAVS, lo que sugiere que la vía de RLRs es activada en respuesta a la infección por el DENV, pero probablemente la inhibición de la inducción de Interferon tipo I por el DENV se bloquea en un paso posterior a la activación de MAVS.

INTRODUCCIÓN

La fiebre del dengue es una de las enfermedades más importantes transmitidas por vector artrópodo. Ésta es causada por la infección con alguno de los 4 serotipos del virus del dengue, el cual es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes*.



Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*. El virus del dengue es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. [Tomado de riverainforma.blogspot.com]

Epidemiología

La primera epidemia conocida de dengue hemorrágico fue reportada en Manila, Filipinas en 1954 y durante los siguientes 20 años el dengue logró extenderse gradualmente a otros países de la región. Las mayores epidemias de dengue ocurrieron en 1980 y 1990 siendo éstas causadas por los 4 serotipos del virus del dengue [1]. En 1998 ocurrieron una serie de infecciones pandémicas por el virus del dengue, reportándose 1.2 millones de casos en 56 países del mundo y repitiéndose este fenómeno en el año 2003 [2]. A pesar de que la fiebre de dengue se conoce desde hace más de 200 años, las causas de la reemergencia global de la epidemia de dengue no están del todo claras. En el siglo XIX la fiebre del dengue era considerada una enfermedad esporádica que causaba epidemias en intervalos largos, sin embargo en los últimos 50 años su incidencia se ha incrementado 30 veces, lo cual se cree que probablemente se debe al crecimiento descontrolado de la población, la urbanización mal planeada, el manejo inadecuado de aguas residuales, lo cual puede producir un incremento en la distribución y densidad del vector y por lo tanto en la distribución del virus.

Ciclo infeccioso

El virus dengue (DENV) existe en la naturaleza en tres ciclos básicos: el ciclo selvático, el rural y el urbano, siendo este último el más importante epidemiológicamente, pues involucra al mosquito *A. aegypti* y al humano. La infección ocurre cuando un mosquito infectado pica a un individuo sano y el virus es introducido al torrente sanguíneo mediante la saliva del mosquito, que es además usada como anticoagulante, mientras el mosquito se alimenta. Posteriormente, cuando un mosquito hembra no infectado se alimenta de la sangre de un individuo infectado, el virus del dengue inicia la infección de diversos tejidos en el vector [3]. Primeramente el virus se replica en el intestino medio, posteriormente llega al hemocele y a la hemolinfa para finalmente alcanzar otros tejidos del insecto. Después de la replicación viral en las glándulas salivales, el mosquito infectado puede transmitir el virus a otro individuo completando de esta forma el ciclo infeccioso. Algunos estudios sugieren la existencia de transmisión transovárica en hembras infectadas, lo que permite la propagación del virus a su progenie. Este proceso funcionaría como un reservorio para la preservación del virus durante periodos interepidémicos sin la participación de hospedero humanos o vertebrados [4]. Se conocen solamente tres hospederos naturales del virus del dengue: el mosquito *Aedes*, humanos y primates no humanos, siendo estos últimos parte del ciclo selvático. Sin embargo, el virus del dengue causa síntomas clínicos y enfermedad solamente en humanos.

Manifestaciones clínicas

El virus del dengue puede provocar diferentes manifestaciones clínicas que se clasifican de acuerdo a su severidad. La infección puede ser asintomática o dar lugar a fiebre indiferenciada, fiebre del dengue (DF), fiebre hemorrágica por dengue (DHF) o síndrome de choque por dengue (DSS) [3]. La fiebre indiferenciada es clínicamente indistinguible de la que provocan otras infecciones virales. La fiebre por dengue se caracteriza por un inicio repentino de fiebre que puede durar de 2 a 7 días, migraña, mialgia, artralgia, vómito, anorexia y erupciones en la piel, de color rojo brillante, llamadas petequias, que suelen aparecer en las extremidades inferiores y el tórax de los pacientes. La fiebre hemorrágica por dengue suele manifestarse principalmente en infecciones secundarias; es decir, una infección por el mismo o diferente serotipo del virus que sucede

tiempo después de la resolución de la infección primaria, también se ha observado que los anticuerpos adquiridos por vía materna dirigidos contra el virus del dengue suelen potenciar las infecciones primarias. La DHF se caracteriza por manifestaciones hemorrágicas como sangrado de nariz, sangrado de encías y vómito con sangre. La forma más grave de la infección es el DSS, el cual se asocia con una alta mortalidad. En personas que presentan DSS se observa la piel descolorida y cianosis acompañada de alteraciones en la circulación y acidosis metabólica que puede llegar a producir encefalopatía [3].

Virus del dengue

El virus del dengue, del cual existen cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) pertenecen al género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), los cuales poseen una cápside icosaédrica rodeada por una membrana lipídica con un diámetro aproximado de 50 nm; el genoma viral es no segmentado de RNA de polaridad positiva de 10.7 kb cuyo extremo 5' se encuentra trifosforilado y tiene una estructura "cap", además su extremo 3' carece de poliadenilación [5]. El genoma tiene un único marco de lectura abierto, flanqueado por dos regiones no traducidas (UTR), que codifica para una poliproteína de alrededor de 3400 aminoácidos que es procesada co- y post-traduccionamente por una serín proteasa viral y múltiples proteasas celulares para dar lugar a tres proteínas estructurales: la proteína del core de la nucleocápside (C), una proteína asociada a membrana (PrM) y la proteína de la envoltura (E); además de 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) [5].

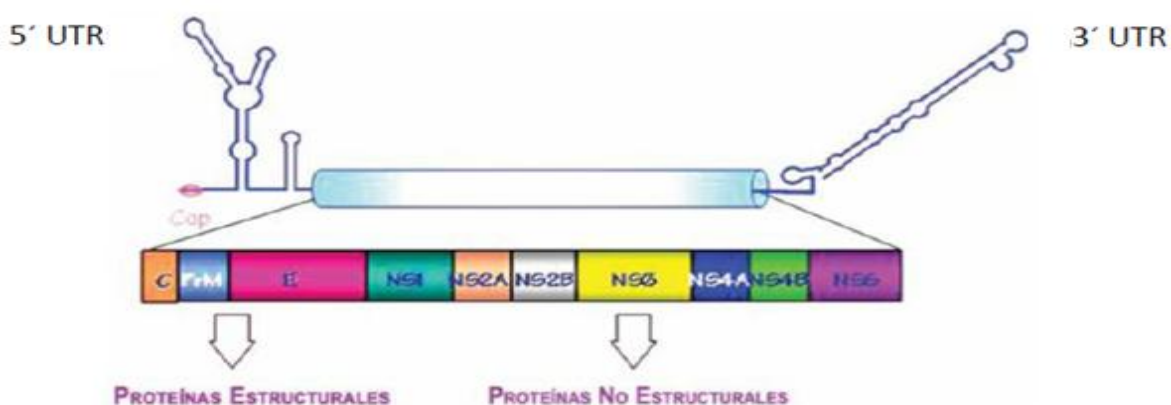


Figura 2. Representación esquemática del genoma del virus DENV. El genoma de DENV mide aproximadamente 11 Kb y contiene un solo marco de lectura abierto flanqueado por dos regiones no traducidas .

La 3' UTR consta de aproximadamente 600 nucleótidos, es altamente estructurada y contiene tres regiones: una región variable (VR) inmediatamente después del codón de paro, una región core río abajo del VR y una región 3' terminal, la cual contiene una secuencia de circularización (CS) complementaria con una secuencia en la 5' UTR, y una estructura de asa y orquilla altamente conservada llamada SL 3' que es indispensable para la replicación viral [6]. Se ha reportado que la 3'UTR está implicada en la circularización del genoma mediante la interacción con la 5'UTR, sin embargo, recientemente se reportó que estas secuencias de circularización son esenciales pero no suficientes para las interacciones de RNA ya que se identificó un elemento de 16 nucleótidos presente en la 5' UTR y 3' UTR (5'y 3' UAR, Upstream AUG Region) como un factor determinante para la asociación RNA-RNA [7]. Las regiones DB1 y DB2 son dos estructuras secundarias conservadas entre los flavivirus; también conocidas como pseudorepetidos y se encuentran adyacentemente una de la otra en la región 3' UTR. Estos elementos constan de 3 hélices y juegan un papel importante en la traducción, la delección de DB1 produce una reducción pequeña pero significativa de la traducción mientras que la delección de DB2 tiene poco efecto; sin embargo al deletar las dos regiones se reduce la eficiencia de la traducción del genoma viral en un 25% en células Vero[8].

La 5' UTR tiene una longitud de 100 nucleótidos y está compuesta por las estructuras secundarias SLA, SLB y CS que son importantes para la replicación viral. Un estudio demostró que SLA es un elemento promotor para la replicación viral, reconocido selectivamente por la RNA polimerasa viral NS5, y por interacciones RNA-RNA, la RNA polimerasa viral es transferida al sitio de inicio en la región 3' del genoma para dar lugar a la síntesis de la cadena negativa [9].

Replicación viral

El virus dengue se une a la célula hospedera mediante su interacción con proteínas de la superficie celular, entre las que se han reportado: CD209 en células dendríticas, heparán sulfato en células Vero y BHK, así como las proteínas HSP70 y 90, y moléculas asociadas a CD14 en monocitos humanos [10-12]. Los viriones se internalizan por endocitosis mediada por receptor, posteriormente el pH ácido del endosoma induce la trimerización irreversible de la proteína E, exponiendo así su dominio de fusión y permitiendo la fusión de la membrana celular con la membrana viral para la liberar la

nucleocápside al citoplasma. Una vez ahí, el genoma viral es traducido a una poliproteína que posteriormente es procesada por proteasas virales y celulares [13]. Finalmente, el genoma viral se replica a una cadena intermediaria de polaridad negativa que servirá de molde para la síntesis del genoma viral de la progenie de polaridad positiva. El proceso de replicación del genoma ocurre en las membranas intracelulares, mientras que el ensamblaje del virus se lleva a cabo en la superficie del retículo endoplásmico cuando las proteínas estructurales y el RNA recién sintetizado geman en el lumen del mismo y por último la maduración del virión se lleva a cabo en la red trans-Golgi [14].

Respuesta inmune durante la infección con dengue

Los blancos primarios durante una infección temprana son las células de Langerhans que se localizan en la epidermis. Y cuando el virus entra al torrente sanguíneo éste puede infectar otros tipos celulares como monocitos, macrófagos y células dendríticas, lo que ayuda a la distribución del virus a otros órganos blanco a través de la circulación. Por otra parte, las células dendríticas infectadas migran hacia los nódulos linfáticos donde se lleva a cabo la presentación antigénica y se activa la respuesta inmune celular y humoral [13].

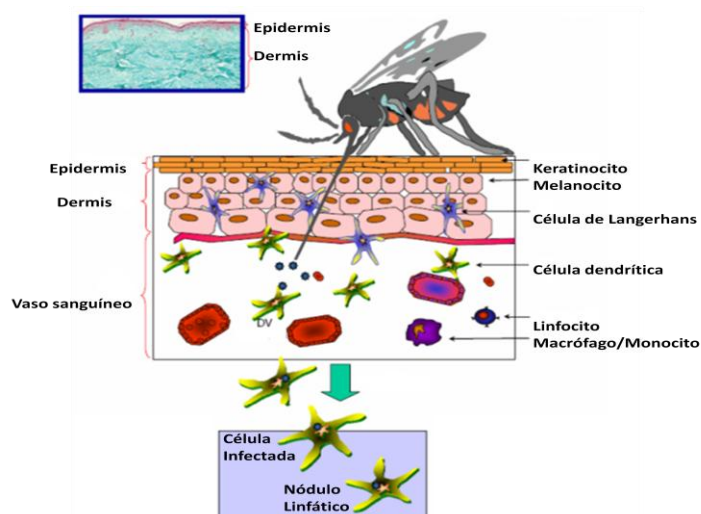


Figura 3. Infección con el virus dengue. La infección por DENV comienza con la picadura del mosquito el cual inyecta el virus mientras se alimenta, infectando primeramente células de Langerhans y posteriormente células dendríticas, las cuales viajan a los nódulos linfáticos para activar la respuesta inmune adaptativa [13].

Durante la etapa temprana de la infección por DENV y mucho antes del desarrollo de la respuesta humoral y celular, los mecanismos de la respuesta inmune innata mediados por el sistema del Interferon tipo I (IFN-I), son las vías más importantes de defensa que limitan la replicación viral [15]. Los interferones son un grupo de citocinas secretadas que actúan a través de un receptor heterodimérico, el cual activa una cascada de señalización que culmina en la transcripción de genes denominados ISGs (Interferon Stimulated Genes), cuyas proteínas tienen efectos antivirales [16-18]. (Fig. 4).

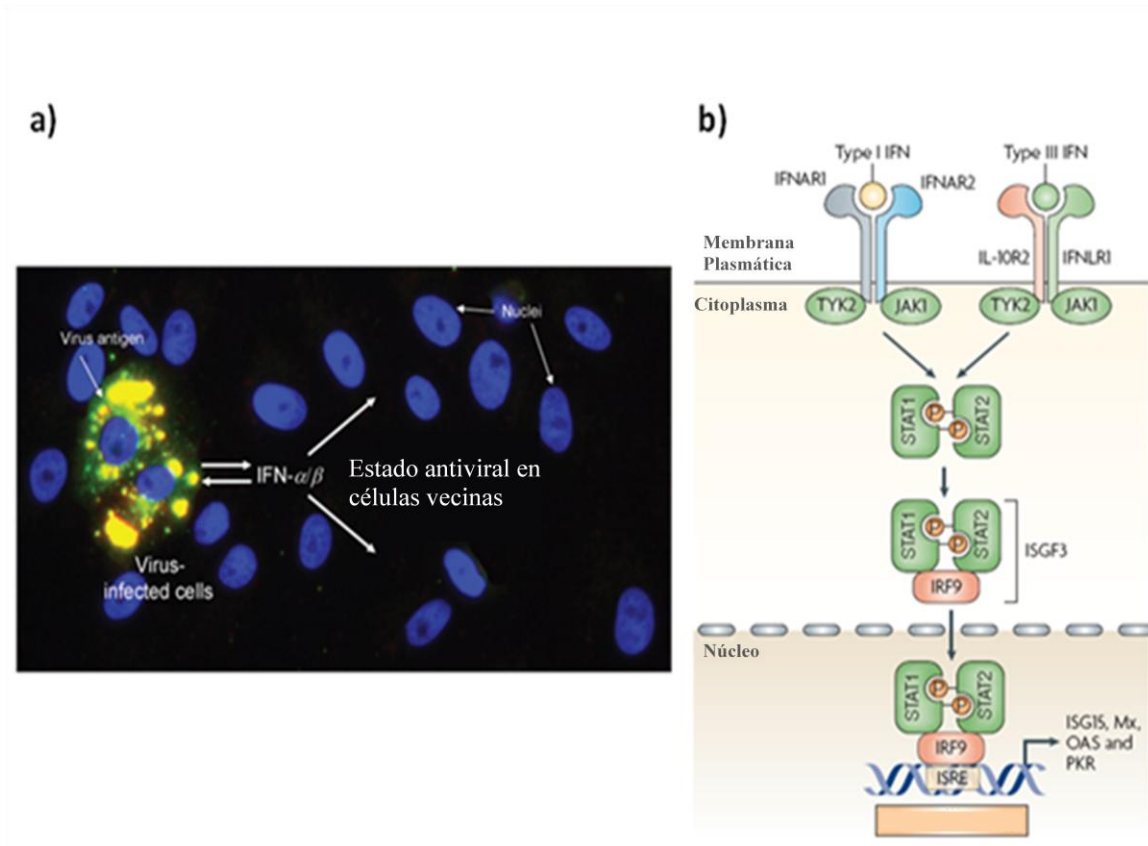


Figura 4. Vía de señalización del IFN-I. a) Estado antiviral inducido por IFN-I en células no infectadas. b) La estimulación con IFN-I activa una cascada de señalización que induce la expresión de genes con efectos antivirales [17].

Se ha reportado que el suero de pacientes con cuadros de dengue clásico presenta niveles elevados de IFN- α/β , TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ e IL-18, mientras que en los pacientes con DHF se presentan niveles más elevados de IFN- γ , TNF- α e IL-18 en suero que en los pacientes con DF, mientras que ocurre lo contrario con la IL-12 [19]. Además se

ha reportado que en ensayos *in vitro* en que se utilizan células mieloides o endoteliales infectadas con DENV se induce la secreción de varias quimiocinas como MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 y RANTES (Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted). RANTES es un miembro de la familia C-C de quimiocinas, que puede reclutar linfocitos y células NK a los sitios de inflamación y los niveles de esta citocina en suero se han correlacionado con la severidad de la enfermedad y la patogenia de DSS [20].

Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs)

La inmunidad innata se caracteriza por el uso de proteínas conocidas como receptores de reconocimiento de patógenos (PRR's) para identificar componentes específicos de microorganismos conocidos como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) [21]. Diversos estudios han identificado 2 familias como los principales de PRR's involucrados en el reconocimiento de ácidos nucleicos virales: Los Receptores tipo Toll (TLRs) y los Receptores tipo RIG-I (RLRs) [22] (Fig. 5). La detección de PAMPs ocurre en diferentes etapas del ciclo replicativo viral y es mediada por TLRs o RLRs dependiendo de la localización del genoma viral [23]. Se han identificado 13 TLR's en mamíferos, de los cuales el TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están implicados en el reconocimiento de ácidos nucleicos microbianos. Los TLRs son proteínas transmembranales localizadas en la superficie de vesículas citoplásmicas como los endosomas o el retículo endoplásmico en donde pueden reconocer virus que entran a la célula por endocitosis mediada por receptor [24]. Debido a que los TLR's son proteínas transmembranales, éstos son incapaces de reconocer componentes virales presentes en el citoplasma. Sin embargo, se han identificado sensores citoplásmicos de RNA producido durante la replicación viral, los cuales constituyen la familia RLR formada por RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I), MDA5 (Melanoma Differentiation Associated 5) y LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) [22, 25, 26].

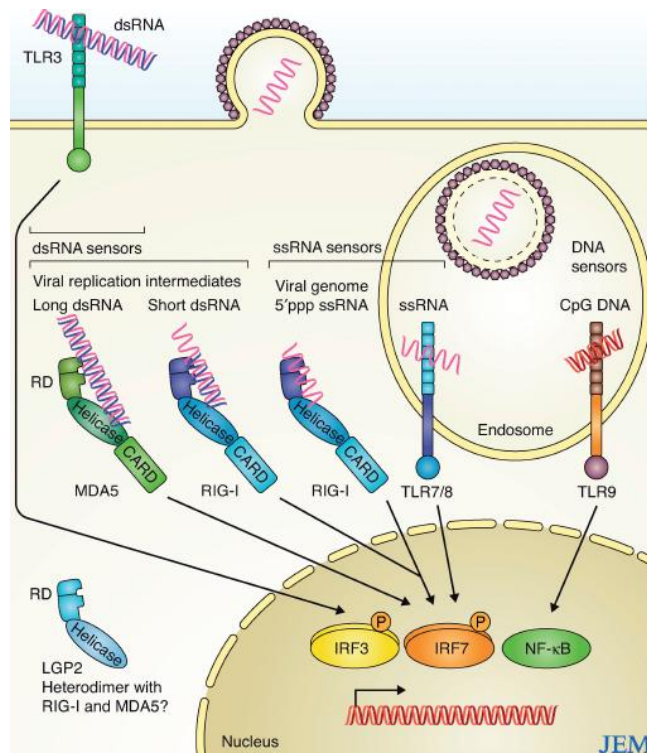


Figura 5. Receptores de reconocimiento de patógenos. Los TLRs y los RLRs reconocen ácidos nucleicos virales e inician la transducción de señales que induce la expresión IFN-I y citocinas proinflamatorias.

RIG-I fue inicialmente identificado como un gen inducido en leucemia promielocítica aguda después de un tratamiento con ácido retinoico [27]. Por otra parte MDA5 fue identificado como un gen sobreexpresado en células de melanoma el cual inducía pérdida irreversible del potencial de crecimiento y diferenciación en respuesta al tratamiento con IFN- β [28]. Pero fue hasta después que su papel como reguladores clave en la respuesta antiviral fue descubierto, cuando RIG-I fue identificado explorando una librería de cDNA obtenida de células tratadas con IFN- β , seleccionando las clonas con capacidad de activar el un vector reportero de IRF-3 en respuesta a la transfección de Poly I:C (RNA sintético de doble cadena) [26].

Dominios funcionales de los RLRs

Todos los miembros de la familia RLR tienen un dominio central de RNA helicasa DExD/H dependiente de ATP [26]. RIG-I y MDA5 poseen 2 dominios en el extremo N-terminal con homología al dominio de activación y reclutamiento de caspasas (CARD). Los dominios CARD son la parte efectora que realizan la transducción de señales cuando se activa la proteína [29]. La sobreexpresión del dominio CARD de RIG-I induce señalización constitutiva en ausencia de infección [25, 26]. RIG-I y LGP2 tienen un dominio de represión (RD) localizado en el C-terminal el cual se cree que interactúan con el dominio de helicasa y los dominios CARD inhibiendo la actividad de la proteína ya que la sobreexpresión de este dominio bloquea la señalización mediada por RIG-I. Recientemente se descubrió un dominio carboxilo terminal que sobrelapa parcialmente con el dominio RD; este dominio consiste en una superficie cóncava básica con residuos acidícos del lado opuesto, que podría funcionar como un dominio de unión a RNA [29].

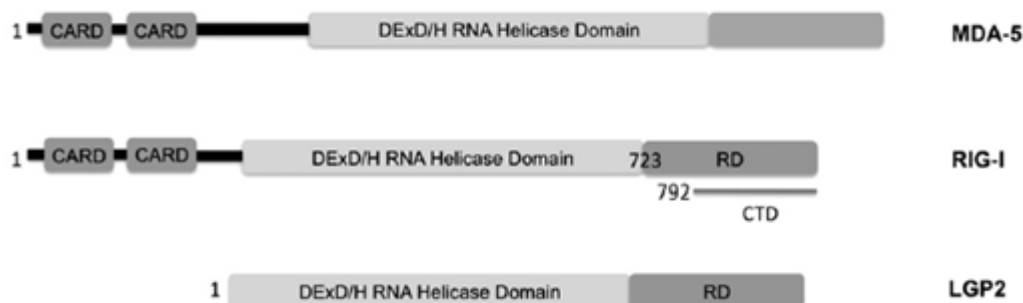


Figura 6. Representación esquemática de los dominios funcionales de las proteínas de la familia RLR. Los RLRs poseen un dominio central de Helicasa DExD/H, RIG-I y MDA5 contienen dos dominios CARD en el extremo amino terminal responsables de la transducción de señales [30].

Reconocimiento de RNA

El papel de RIG-I como sensor viral citoplásmico se descubrió cuando se realizó una búsqueda de moléculas involucradas en la expresión de IFN- β inducida por RNA de doble cadena [26]. Se demostró que la sobreexpresión de RIG-I daba como resultado una mayor activación del promotor de IFN- β en respuesta a la introducción de dsRNA al citoplasma [26]. Posteriormente se demostró mediante ensayos de pull down que RIG-I se une a Poly I:C (RNA sintético) pero no a RNA de cadena sencilla ni a dsDNA. La importancia de

RIG-I en el reconocimiento viral se enfatizó cuando se demostró que la producción de IFN-I en respuesta a la infección con paramixovirus era deficiente en células dendríticas de ratones RIG-I^{-/-} [31, 32]. Además, la sobreexpresión de MDA5 también aumento la respuesta de IFN-I en células infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle y redujo la carga viral del virus de la estomatitis vesicular y del virus de la encefalomiocarditis [32].

Basándose en lo anterior se especuló que RIG-I y MDA5 reconocían específicamente dsRNA producido durante la replicación viral. Sin embargo, diferentes experimentos de silenciamiento aportaron evidencia de la existencia de un reconocimiento diferencial por esta dos proteínas, la administración de Poly I:C a ratones silvestres o RIG-I^{-/-} dio lugar a niveles similares de IFN-I y citocinas, mientras que los ratones MDA5^{-/-} no producían IFN-I o interleucinas en respuesta a Poly I:C [33]. En contraste, los fibroblastos de ratón MDA5^{-/-} responden normalmente a dsRNA transcritos *in vitro* mientras que los fibroblastos RIG-I^{-/-} no lo hacen, por lo que se concluyó que MDA5 reconoce Poly I:C *in vivo* e *in vitro* mientras que RIG-I reconoce Poly I:C *in vitro* pero no *in vivo*, teniendo este ultimo mayor afinidad a los transcritos de RNA [33].

Además, la producción de IFN-I es defectuosa en fibroblastos de ratón RIG-I^{-/-} infectados con el virus de la estomatitis vesicular, influenza y con el virus de la encefalitis japonesa, en contraste RIG-I es dispensable para la producción de IFN-I en respuesta a la infección con el virus de la encefalomiocarditis [31]. Lo anterior sugería la existencia de otros patrones moleculares asociados a patógenos aparte del dsRNA, presentes en el RNA viral y ausentes en el RNA celular, que eran responsables de la inducción de IFN-I mediante RIG-I y MDA5.

También, se ha observado que las modificaciones postranscripcionales eucarióticas del RNA, como adición de una estructura Cap de 7-metil-guanosina o γ -monometilfosfato, la eliminación del 5'ppp que resulta en un grupo 5' monofosfato, o la sustitución de uridina por pseudouridina, abaten la expresión de IFN-I mediada por RIG-I [34], lo que posteriormente llevó a la conclusión de que un grupo trifosfato en el extremo 5' (5'ppp) era el responsable de la inducción de IFN-I [35]. Lo anterior llevó a la conclusión de que el grupo 5'ppp era el PAMP responsable de la discriminación entre el RNA celular y el viral,

ya que la mayoría de los RNAs celulares carecen de este grupo y por lo tanto son incapaces de activar a RIG-I, además la remoción del 5'ppp por métodos enzimáticos abate la transducción de señales pero no afecta la unión a RNA.

Por otra parte experimentos de ratones Knock Out (KO) de MDA5 demostraron que esta molécula es crucial para la detección de la infección con picornavirus pero no de influenza o paramixovirus. Dichos ensayos son consistentes con el hecho de que el extremo 5' del genoma de los picornavirus no contiene un grupo 5'ppp libre, si no que éste se encuentra unido covalentemente a una proteína VPg, que bloquea el reconocimiento por RIG-I [36]. A diferencia de RIG-I, el ligando de MDA5 no ha sido bien caracterizado. Algunos estudios apuntan a que reconoce regiones altamente estructuradas en los extremos 5' y 3' de las regiones no traducidas de los genomas virales o estructuras tipo red similares a las uniones de Holliday en el RNA [37].

A pesar de que RIG-I tiene un dominio con homología a RNA helicasas, éste carece de motivos de unión a RNA por lo cual el mecanismo de interacción con RNA no estaba claro en un principio. Un estudio de cristalografía y resonancia magnética nuclear demostró que el dominio CTD de RIG-I es el responsable de la unión a RNA y 5'ppp [38]. A pesar de esto, el mecanismo de discriminación de los ligandos de RIG-I y MDA5 se desconoce. Ambas proteínas poseen dominio CTD con residuos comunes, sin embargo, existe una lisina invariable en el centro del CTD de RIG-I pero ausente en MDA5 y LGP2, la cual podría estar involucrada en la interacción con el 5'ppp [38].

El Poly I:C disponible comercialmente tiene una longitud de por lo menos 3 kbp, cuando se acorta el polímero por debajo de 300 bp, éste pierde la capacidad de activar MDA5 pero no a RIG-I. Un descubrimiento consistente con lo anterior es el hecho de que los fragmentos cortos de dsRNA del genoma de reovirus (1.2-1.4 kbp) activan selectivamente a RIG-I mientras que los fragmentos más largos (3.4 kbp) activan a MDA5 [39]. Aunque se ha demostrado que RIG-I tiene la capacidad de unirse a poly I:C, se cree que este puede unirse a dsRNA largo pero este induce una conformación desfavorable para la señalización. La hipótesis anterior se ve reforzada por el hecho de que la unión de RIG-I a dsRNA corto o 5'ppp produce un fragmento de 17 kDa y otro de 30 kDa resistentes a la digestión con proteasa, mientras que la unión de RIG-I a dsRNA largo produce un fragmento de 60 kDa [39, 40].

En conjunto los experimentos realizados hasta la fecha indican que RIG-I y MDA5 reconocen diferentes virus, aunque ciertos estudios con flavivirus sugieren un papel redundante para estas dos proteínas [41, 42]. (Véase Fig. 8).

Señalización por RLRs

Con el conocimiento actual se especula que tanto RIG-I como MDA5 se encuentran en una conformación de autorepresión en ausencia de sus ligandos debido a la interacción del dominio RD con los dominios CARD y el dominio de helicasa. La unión con sus ligandos induce un cambio conformacional que libera los dominios CARD [40].

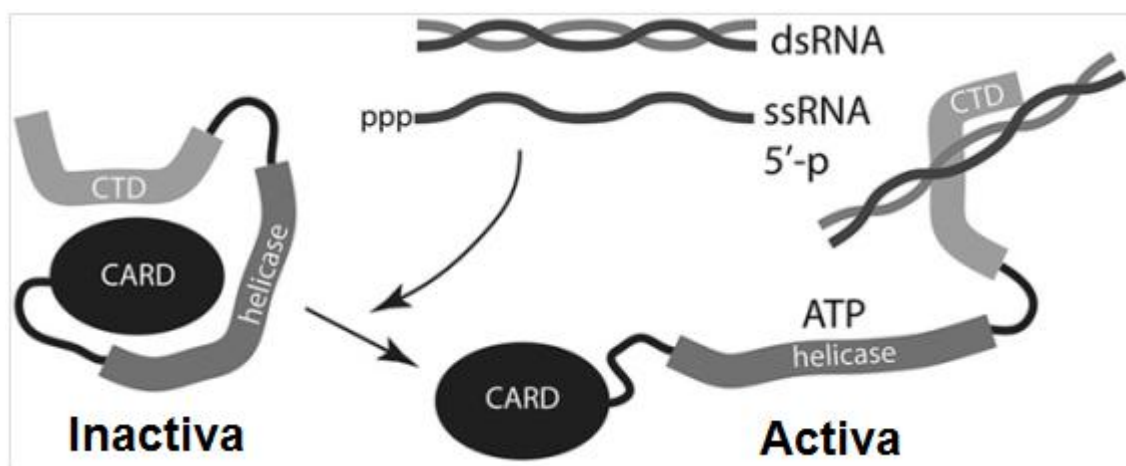


Figura 7. Modelo de activación de RLRs. La unión de RLRs con sus ligandos induce un cambio conformacional que libera los dominios CARD de su autorepresión permitiéndoles interactuar con MAVS [30].

Dicho cambio conformacional permite la interacción de los dominios CARD de RIG-I y MDA5 con el dominio CARD de una proteína llamada IPS-1/**MAVS**/VISA/CARDif, que se encuentra anclada a la membrana externa mitocondrial [43]. La señalización por RLRs se encuentra regulada a diferentes niveles; LGP2, el tercer miembro de esta familia, fue el primer regulador descrito de RIG-I y MDA5, y se creó que ejerce su función de diferentes formas. Un mecanismo es secuestrando los ligandos de RIG-I y MDA5, ya que LGP2 también es una RNA helicasa DExD/H con alta homología en el dominio CTD con RIG-I y MDA5; éste puede unirse a RNA y competir por los ligandos,

pero debido a que LGP2 carece de los dominios CARD, es incapaz de interactuar con MAVS y por lo tanto de transducir señales [25]. Otra forma por la cual LGP2 inhibe la actividad de RIG-I es mediante la presencia del dominio RD, el cual interactúa con el dominio RD de RIG-I lo que previene la homodimerización de RIG-I necesaria para su activación [22]. En otro estudio se reportó la interacción de LGP2 con el dominio C-terminal y las regiones transmembranales de MAVS, compitiendo de esta forma por la unión con la cinasa río abajo Ikki/Ikke [22].

Posteriormente MAVS se asocia con TRAF3 (TNF-Receptor-Associated Factor 3), una Ubiquitin (Ub) ligasa que ensambla cadenas de PolyUb en Lys63 a través de su dominio C-terminal [44]. Otra Ub ligasa llamada DUBA desubiquitina a TRAF3, inhibiendo la señalización por RLRs [45]. TRAF3 recluta y activa dos cinasas relacionadas con IKK, llamadas TANK y TBK1 (TANK Binding Kinase 1) o IKK ϵ (Inducible I κ B kinase), las cuales fosforilan a IRF-3 e IRF-7 [46]. La fosforilación de IRF-3 e IRF-7 induce la formación de homodímeros o heterodímeros que son translocados al núcleo, donde se unen a ISREs (IFN Stimulated Response Elements), estimulando la expresión de IFN- α/β y genes inducibles por IFN (ISGs) [47]. Por otra parte MAVS interacciona con la proteína FADD (Fas Associate Death Domain), que a su vez interacciona con caspasa-8 y caspasa-10 para activar a NF κ B río abajo de MAVS, que da lugar a la expresión de citocinas proinflamatorias [48].

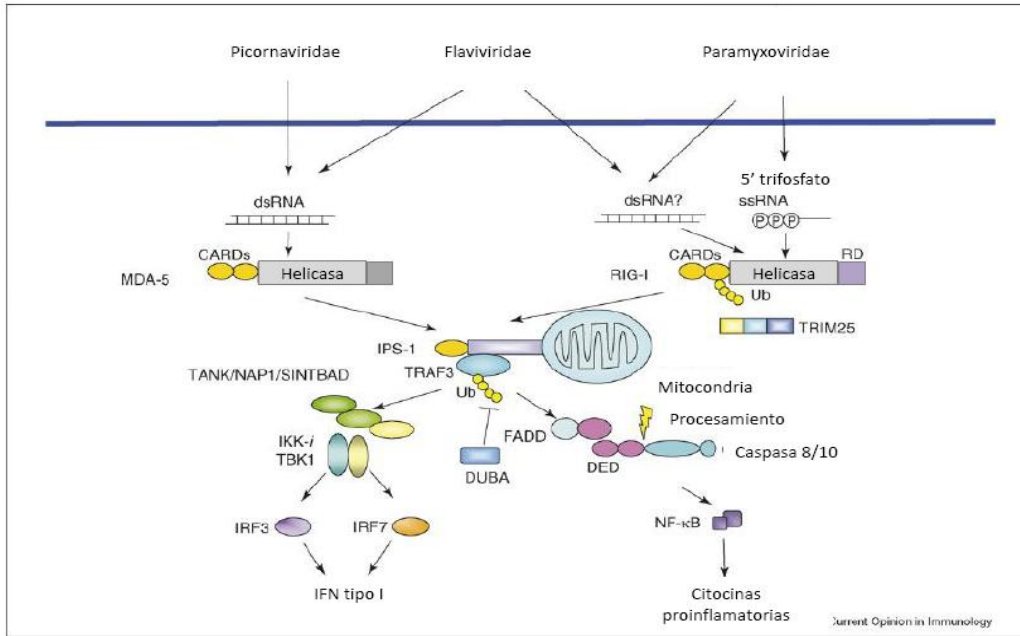


Figura 8. Señalización por RLRs. La señalización por RIG-I y MDA5 converge en IPS-1, la cual a través de TRAF3 recluta a TANK y TBK1, las cuales fosforilan a IRF-3/7 y cuya translocación al núcleo induce IFN-I. NFκB también es activado por IPS-1 ó MAVS vía caspasa 8/10 [49].

Antecedentes

Hasta hace poco se sabía que los únicos PAMPs que inducen la expresión de IFN- α/β mediada por RIG-I eran el 5'ppp y dsRNA. Sin embargo, un estudio reciente demostró que la transfección de las regiones 5' y 3' UTR de HCV completas (las cuales presentan estructura secundaria), inducían un incremento en la actividad del promotor de IFN- β , a diferencia de otras regiones de la UTR 3' de HCV que mostraron poca o nula capacidad de activar el promotor de IFN- β . Posteriormente se determinó que la región de la UTR 3' del genoma de HCV (correspondiente a los nts 9384 al 9619) era la secuencia mínima responsable de la activación del promotor de IFN- β [34]. Lo anterior sugería que la UTR 3' de HCV contiene un PAMP que despierta la respuesta inmune innata.

La UTR 3' de HCV (Fig. 9) está compuesta por tres regiones: una región variable con estructura secundaria potencial, una región no estructurada que contiene poliuridinas y ribocitocinas dispersas (Poly U/UC); y una región terminal llamada X que presenta 3 estructuras conservadas de tallo y burbuja [50].

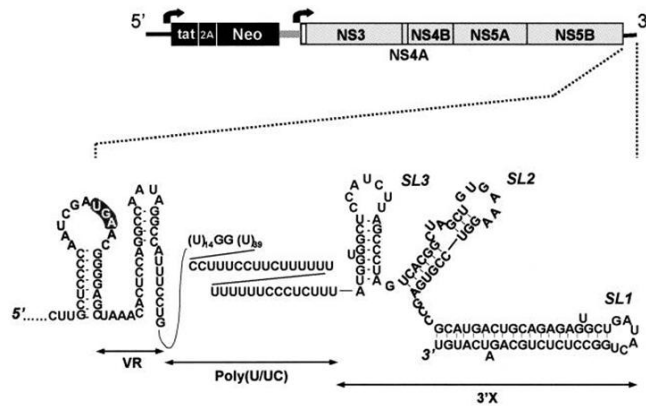


Figura 9. Representación esquemática de la UTR 3' de HCV. La UTR 3' contiene una región variable, seguida de repetidos de uridinas (Poly U/UC) y la región 3'X con las estructuras SL1, SL2 y SL3 [50].

En un intento por caracterizar el ligando de RIG-I, se evaluó la capacidad de cada una de estas regiones de inducir la expresión de IFN- β dando como resultado que sólo la región Poly U/UC fue capaz de estimular la formación de dímeros de IRF-3 y la expresión de ISG56. Posteriormente, se demostró que el grupo 5'ppp es requerido para la unión estable de RIG-I a la región Poly U/UC y que es necesario para que la región Poly U/UC induzca la señalización mediada por RIG-I [34]. Mediante experimentos de mutagénesis, se

demostró que el 5'ppp es necesario pero no suficiente para inducir la señalización por RIG-I, ya que secuencias homopoliméricas como PolyA, a pesar de tener un grupo 5'ppp no activaron el promotor de IFN-I [51]. Por otra parte, mediante ensayos realizados con RNA quiméricos se determinó que la detección de RNA viral por RIG-I es dependiente de longitud y secuencia [34].

Hasta la fecha, el motivo Poly U/UC presente en la UTR 3' del genoma de HCV es la única secuencia mínima reportada que induce señalización por RIG-I. Sin embargo, se ha reportado que RIG-I es capaz de inducir la expresión de IFN- α/β en respuesta a la infección por virus de los géneros *Rhabdovirus*, *Paramyxovirus*, *Orthomyxovirus*, *Flavivirus* y *Filovirus*, entre otros [30].

Desde hace tiempo se ha reportado que los pacientes con fiebre por dengue y DHF, presentan niveles elevados de IFN- α en suero, al igual que en los cultivos de células infectadas con DENV-2. De la misma forma, la infección por DENV-2 en células alveolares A549 y células hepáticas de Chang induce la expresión de IFN- β . Sin embargo, la primera evidencia de que la expresión de IFN- β inducida por DENV-2 era mediada por RIG-I se dio a conocer cuando la sobreexpresión de un dominante negativo de la proteína RIG-I abatió la formación de dímeros de IRF-3 en respuesta a la infección con DENV-2 en células Vero [52] (Fig. 10).

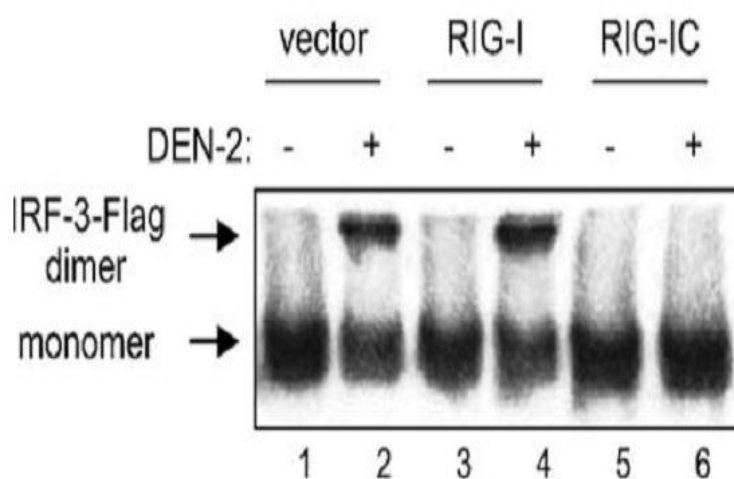


Figura 10. Activación de IRF-3 en respuesta a la infección. Ensayo de inmunodetección de la proteína IRF-3, donde se observa que la transfección de un dominante negativo de RIG-I (RIG-IC) inhibe de la formación de dímeros de IRF-3 en células Vero infectadas con el DENV-2 [52].

Posteriormente, se observó que fibroblastos de ratones KO para RIG-I infectados con DENV-2 aún expresaban IFN-I en respuesta a la infección, lo que sugería la participación de otro sensor de RNA viral. Sin embargo cuando se silenció MDA5 en fibroblastos knockout de RIG-I, (creando un doble knockout), se abatió la expresión de ISGs con lo que se pudo sugerir que DENV-2 es reconocido tanto por MDA5 como por RIG-I [21].

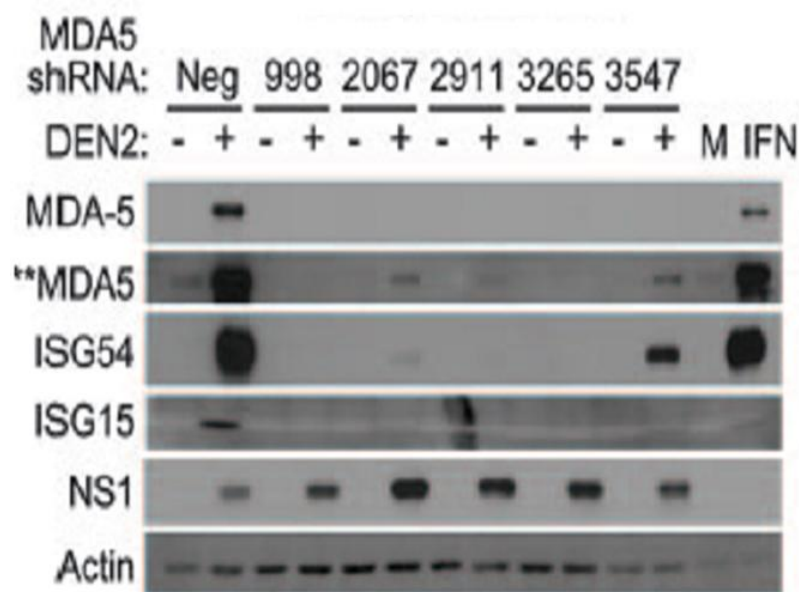


Figura 11. Inhibición de la expresión de ISGs en respuesta a la infección con DENV-2. Detección de MDA5, ISG54, ISG15 y NS1 de DENV-2 mediante western blot en fibroblastos de ratón infectados con DENV-2 a MOI de 1 a las 16 h post-infección, donde se observa que el silenciamiento de MDA5 en fibroblastos de ratón KO para RIG-I, inhibe la expresión de ISGs en respuesta a la infección [21].

De la misma manera, se ha estudiado la capacidad las UTRs de diferentes flavivirus de inducir expresión de IFN- β , entre ellas las del genoma de DENV-4. Los resultados obtenidos indicaron que tanto la UTR 5' como la 3' completa de DENV-4 (105 y 383 nts respectivamente), transcritas *in vitro* son capaces de inducir la expresión de IFN- β en células Huh-7 mediante ensayo de reporteros. Además se pudo determinar que la región SL de la UTR 3' de DENV-4 no contribuía en la activación de esta vía [34].

Las secuencias mínimas presentes en la 5' UTR y 3' UTR de DENV-2 que despiertan la respuesta inmune mediada por RIG-I no han sido mapeadas. Sin embargo, estos RNAs difieren considerablemente con respecto a los de HCV, ya que carecen de los repetidos de uridina o adenina como los que se encuentran presentes en la 3' UTR sentido y antisentido; lo que sugiere que otras secuencias diferentes de Poly U/UC o Poly AG/U pueden ejercer activación de la expresión del IFN- β en el caso de DENV.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los mecanismos de respuesta antiviral activados durante la infección por DENV es de vital importancia para lograr una mayor comprensión de las interacciones hospedero-parásito, y por lo tanto de la patogenia de la enfermedad. Los receptores tipo RIG-I juegan un papel crucial en la activación temprana de la respuesta antiviral, en el caso de DENV se ha estudiado el papel de los RLRs en sistemas que no representan el blanco u hospedero natural del virus, por lo que es necesario un estudio en células que son blancos naturales de infección. Por otra parte, las diferencias entre el ligando de RIG-I y MDA5 no han sido aclaradas completamente, por lo que un estudio con un virus que sea capaz de activar la señalización a través de ambos receptores podría dar a conocer mejor las diferencias entre los ligandos de ambas moléculas.

HIPÓTESIS

RIG-I participa en el reconocimiento de DENV-2 e induce la expresión de IFN- β mediante la activación de la vía de RLRs y su inhibición es capaz de abatir la respuesta antiviral y modular la replicación viral.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la activación de la vía de RLRs en respuesta a la infección por DENV-2.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de la sobreexpresión e inhibición de RIG-I sobre la replicación viral e inducción de IFN- β .
- Determinar las regiones de la 5' y 3' UTR del genoma del virus del dengue que inducen la respuesta antiviral dependiente de RIG-I.
- Evaluar la activación de RIG-I y MAVS en respuesta a la infección con DENV-2.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo de líneas celulares.

Las células de hepatoma humano Huh-7 fueron sembradas y mantenidas en placas de 24 pozos a una densidad de 5,0000 cels/pozo en medio Advanced DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 5% y glutamina 10 mM a 37°C con CO₂ al 5%. Éstas se trabajaron 24 h después de sembradas, cuando alcanzan confluencia de 80%.

La línea celular monocítica U937 se creció en medio RPMI suplementado con 4 mM de L-Glutamina, suero fetal bovino al 10 % y penicilina 5 U/ml y de estreptomicina 5 µg/ml. Las células se diferenciaron a macrófagos por la adición de PMA [phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma Aldrich)] a una concentración final de 160 nM 48 h antes de realizar la transfección.

Virus e infección.

Se utilizó DENV-2 cepa Nueva guinea C el, cual se propagó en cerebros de ratones BALB/C neonatos. Las partículas virales se purificaron por centrifugación y se plaquearon en células BHK-21 para obtener el título viral. Las células Huh-7 y U937 se infectaron a una MOI de 3 y se incubaron 2 h a 37° C para después retirar el medio y reemplazarlo con medio fresco.

Plásmidos.

Los vectores pEF-flagRIG-I y pEF-flagΔRIG-I fueron donados gentilmente por el Dr. Takashi Fujita (Kyoto University, Japan). Brevemente, el vector pEF-flagRIG-I contiene el inserto completo de RIG-I fusionado a una etiqueta flag en el extremo N-terminal y éste se encuentra regulado bajo el promotor de EF-1α. El vector pEF-flagΔRIG-I contiene las mismas características que el vector descrito anteriormente pero contiene una sustitución de lisina por alanina en el aminoácido 270, dicha mutación se localiza en el dominio de ATPasa, la cual no afecta la actividad de unión a RNA pero inhibe la señalización de RIG-I funcionando como dominante negativo [26].

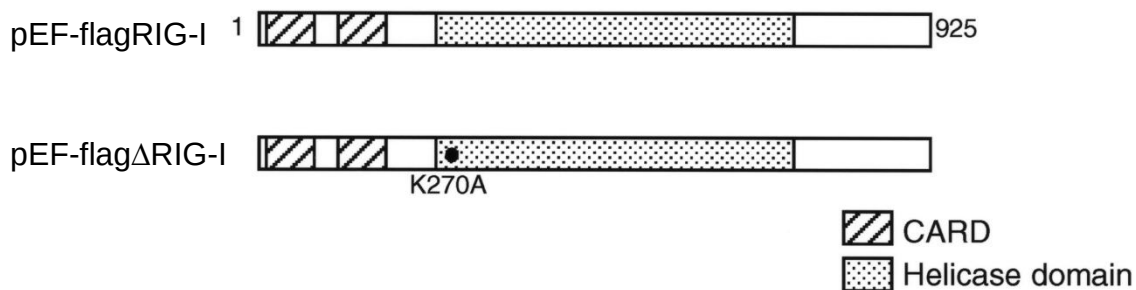


Figura 12. Vectores de RIG-I. La sustitución de alanina por lisina en el aminoácido 270 del dominio de helicasa produce un dominante negativo que inhibe la señalización de la proteína RIG-I nativa [26].

Transfección de los vectores RIG-I y ΔRIG-I en las líneas celulares.

Las células Huh-7 o U937 sembradas en placa de 24 pozos se transfectaron con 1 μg de DNA del vector pEF-flagRIG-I ó pEF-flagΔRIG-I por medio de lipotransfección utilizando el reactivo Superfect (Qiagen), para lo cual se llevó el DNA a un volumen de 60 μl con medio sin suero y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se añadieron 2 μl del reactivo de transfección, la mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección, y esta mezcla se llevó a un volumen de 250 μl con medio sin suero. A continuación se retiró el medio y se añadió la mezcla que contiene los complejos de transfección directamente sobre la monocapa y se incubó durante 4 h a 37°C, después se retiró el medio que contiene los complejos de transfección y se reemplazó por medio fresco para disminuir la citotoxicidad producida por el reactivo de transfección. La expresión de la proteína y RNA mensajero de RIG-I se detectó a las 48 h post-transfección.

RT-PCR en Tiempo Real.

Para realizar la RT-PCR en tiempo real, el RNA total se extrajo con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue tratado con DNAsa (Biolabs) y 1 μg de RNA fue retrotranscrito con el kit High capacity cDNA transcription (Applied Biosystems). La qPCR se llevó a cabo utilizando TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) y sondas TaqMan (Applied Biosystems) para IFN-β y HPRT como control de carga. Para la qPCR de DENV-2, RIG-I, MDA5 y LGP2 se utilizó DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) y Evagreen (Biotium), usando los siguientes oligonucleótidos:

DENV-NS5

Fw 5'TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA3'

Rv 5'GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCA3'

RIG-I

Fw 5'AAACCAGAGGCAGAGGAAGAGCAA3'

Rv 5'TCGTCCCATGTCTGAAGGCGTAAA3'

MDA5

Fw 5'GGCATGGAGAATAACTCATCAG3'

Rv 5'CTCTTCATCTGAATCACTTCC3'

LGP2

Fw 5'CTGGAGACCCTTCAGGGG3'

Rv 5' CAATGAGGTGGTCAGTCCAG3'

GAPDH

Fw 5'GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC3'

Rv 5'GAAGATGGTGATGGGATTTC3'.

Los datos resultantes se analizaron utilizando el método $\Delta\Delta Ct$.

Microscopía confocal.

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia de la proteína RIG-I, las células Huh-7 ó U937 se sembraron y transfectaron sobre laminillas de vidrio, se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 min, posteriormente se permeabilizaron con acetona a -20 °C, y se bloquearon con suero fetal bovino al 3% en PBS una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario contra RIG-I (Santa Cruz Biotechnology) se incubó toda la noche a 4°C y después se lavó el con PBS para después incubar con el anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (Jackson ImmunoResearch) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI por 2 min, y se lavaron las células con PBS. Para la inmunofluorescencia de la proteína E de DENV-2, las células Huh-7 ó U937 se trataron de la forma descrita previamente, incubadolas con un anticuerpo primario policlonal dirigido contra la proteína E de DENV (Chemicon) y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch). Para la proteína MAVS se utilizó un anticuerpo monoclonal (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch). Las mitocondrias fueron teñidas con Mitotracker deep red (Invitrogen). Las laminillas se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2).

Obtención de las diferentes regiones de las UTR's de DENV-2.

Para obtener por PCR las regiones no traducidas del virus del dengue se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

UTR 5' completa: UTR 5' completa desde la región SLA hasta la CS

Iniciador sentido 5'TAATACGACTCACTATAGGGGAGTTGTTAGTCTACGTGG3'

Iniciador antisentido 5'CAGCATATTGAAAGGCGT3'

UTR 3' completa: UTR 3' comprende desde la región DB2 hasta la región SL.

Iniciador sentido 5'TAATACGACTCACTATAGGGGGGGAGGCCACAAACC3'

Iniciador antisentido 5'AGAACCTGTTGATTCAAC3'

UTR 3' DBI-DB2: Comprende desde la región DB1 hasta la región DB2

Iniciador sentido 5'TAATACGACTCACTATAGGGGTGGGGGCCCAAGGCG3'

Iniciador antisentido 5'AGAACCTGTTGATTCAAC3'

Estos oligonucleótidos contienen el promotor de la RNA polimerasa T7 (Nucleótidos subrayados), los cuales se utilizaron posteriormente para realizar la transcripción *in vitro*. Como DNA molde se utilizó un replicón de GFP-DENV basado en la secuencia de DENV-2. La PCR se llevó a cabo utilizando Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% tenido con bromuro de etidio, la banda se purificó utilizando el kit Quick gel extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificando el producto por espectrofotometría (Nanodrop Thermo Scientific).

Trascripción *in vitro*.

Con los productos de PCR purificados se realizó la transcripción *in vitro* de la UTR 5', UTR 3' y de la región DB1-DB2 con el kit Ampliscribe T7 (Epicenter) en una mezcla de reacción con 1 µg de DNA Templado linearizado, 2 µl 10X AmpliScribe T7 Buffer, 1.5 µl 100 mM ATP, 1.5 µl 100 mM CTP, 1.5 µl 100 mM GTP, 1.5 µl 100 mM UTP, 2 µl 100 mM DTT, 0.5 µl RiboGuard Inhibidor de RNAasa, 2 µl Enzima AmpliScribe T7. La mezcla de reacción se incubó a 37° C durante 3 h, posteriormente, se precipitó el RNA durante la noche con 1/10 volumen acetato de sodio y 3 volúmenes de etanol. El RNA se centrifugó a 13,000 RPM y se trató con DNAasa. Los productos de la transcripción *in vitro* se cuantificaron por espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific) y se corrieron en gel

de agarosa al 1.5 % para verificar el tamaño del transcrito. Adicionalmente, se realizó la transcripción *in vitro* de la UTR 5' en presencia del reactivo de Cap para obtener transcritos con estructura de 7-metil-guanosina en el extremo 5'.

Transfección de UTRs en las líneas celulares.

Las células Huh-7 o U937 fueron transfectadas con la UTR 5', UTR3' ó la región 3' DB1-DB2 del virus del dengue, se tomaron 5 µg del producto de la transcripción *in vitro* y se diluyeron en medio sin suero, paralelamente se mezclaron 2 µl del reactivo de lipotransfección para RNAs pequeños (Dharmafect) con 25 µl de medio sin suero. Posteriormente las dos mezclas anteriores se combinaron e incubaron durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección. Finalmente se agregaron 450 µl de medio sin suero, lo cual se adicionó lentamente sobre la células. Los diferentes fragmentos transcritos fueron transfectados en células Huh-7 ó U937 de la siguiente manera:

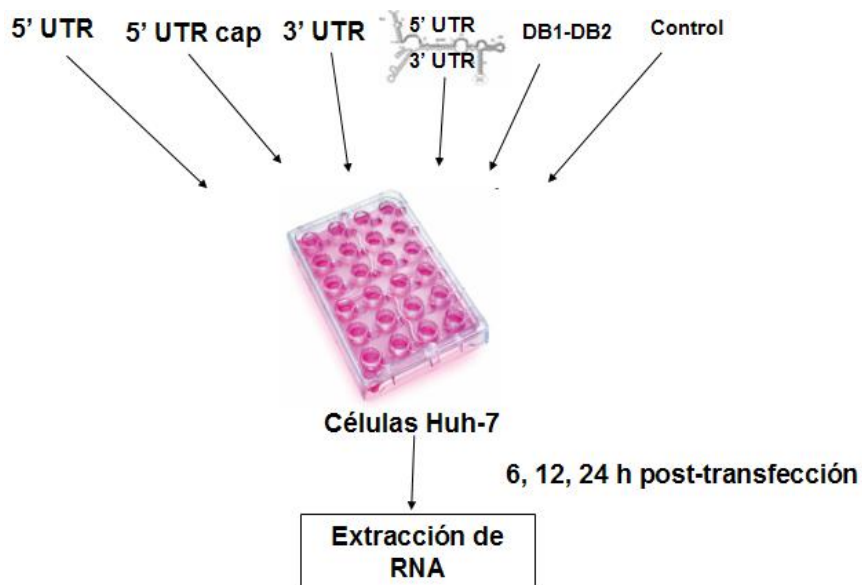


Figura 13. Esquema de transfección de las diferentes regiones en células Huh-7. Las diferentes regiones que se delimitaron fueron transfectadas de la forma indicada en células Huh-7 para evaluar la expresión de IFN-β a las 6, 12 y 24 h post-transfección.

Inmunoprecipitación de RNA (RIP)

Para realizar los ensayos de RIP, las células Huh-7 se transfectaron con el vector pEF-flagRIG-I para inducir la sobreexpresión de RIG-I con etiqueta flag. A las 24 h post-transfección estas células fueron infectadas con DENV-2 por 24 h, luego se lisaron con polysome lysis buffer [10 mM HEPES pH 7, 100 mM KCl, 5 mM Mg₂Cl, 25 mM EDTA, 0.5% IGEPAL, 2 mM DTT y 50 U/ml RNase out (Invitrogen)]. El extracto ribonucleoproteico se incubó con un anticuerpo conjugado a perlas de agarosa dirigido contra la etiqueta flag (Sigma) por 6 h en agitación suave a 4° C. El extracto fue lavado 8 veces con buffer NT2 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05% IGEPAL, suplementado con 50u/ml RNase out, 2 mM DTT and 30 mM EDTA). El RNA fue extraído de las perlas con trizol, el cual fue tratado con DNAsa (Biolabs) y retrotranscrito utilizando hexámeros al azar como oligonucleotidos (Applied Biosystems). Con el cDNA obtenido se realizó PCR en punto final con un par de oligonucleótidos que amplifican específicamente un fragmento de 266 pb de la región NS5 del genoma de DENV. Como control no relacionado se realizó la amplificación del mRNA del gen GAPDH. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Sobreexpresión de RIG-I

La respuesta inmune innata contra la infección viral es una de las principales formas en las que el organismo enfrenta a los patógenos. Una de las principales vías de reconocimiento de patógenos son los anteriormente mencionados RLRs, los cuales han sido relacionadas previamente con la inducción de la respuesta antiviral contra DENV, por lo tanto el objetivo de este estudio fue determinar el papel que tiene RIG-I en el proceso infeccioso de DENV.

Para llevar a cabo este estudio se eligió la línea celular hepática Huh-7, ya que el hígado es uno de los órganos seriamente afectados en la infecciones severas con el virus del dengue.

En primera instancia, se propuso sobreexpresar la proteína RIG-I y RIG-I mutado en el dominio de ATPasa (Δ RIG-I), utilizando los vectores pEF-flagRIG-I ó pEF-flag Δ RIG-I respectivamente, los cuales se lipotransfectaron en células Huh-7 a 80% de confluencia. A las 24 h post-transfección se evaluó la expresión de RIG-I mediante RT-PCR en tiempo real y microscopía confocal.

El RNA fue extraído por el método de Trizol, se trató con DNAasa y se retrotranscribió. El cDNA obtenido de células Huh-7 transfectadas o no con el vector pEF-flagRIG-I ó pEF-flag Δ RIG-I se utilizó para realizar, primero la PCR en punto final y posteriormente la PCR en tiempo real. Con la finalidad de confirmar la sobreexpresión de RIG-I a nivel de mRNA se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de dicho transcrito de 150 pb. Como control de carga se utilizó la amplificación del mRNA del gen constitutivo GAPDH. Los resultados de la RT-PCR en punto final muestran un aumento en la expresión de RIG-I en las células transfectadas con los vectores de RIG-I (Fig. 14).

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real fueron analizados mediante el método $\Delta\Delta$ Ct, y muestran un incremento significativo en la expresión de RIG-I y Δ RIG-I en células transfectadas con los vectores. Paralelamente se detectaron los niveles de la proteína RIG-I mediante microscopia confocal (Fig.15).

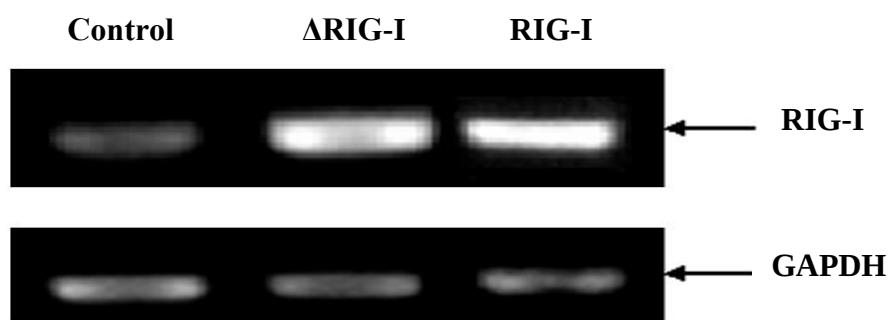


Figura 14. Determinación de los niveles de expresión de RIG-I y Δ RIG-I mediante RT-PCR en punto final. Las células Huh-7 se transfectaron ó no con los vectores pEF-flagRIG-I (RIG-I) ó pEF-flag Δ RIG-I (Δ RIG-I), a las 24 h post-transfección el RNA total fue extraído, el cual fue utilizado para realizar la RT-PCR en punto final para la amplificación de un fragmento del gen RIG-I y GAPDH como control de carga. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1.5%.

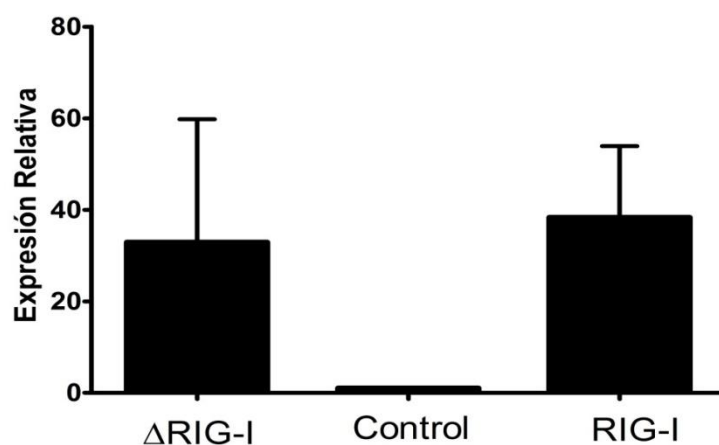


Figura 15. Determinación de los niveles de expresión de RIG-I mediante qRT-PCR. El RNA extraído de células Huh-7 transfectadas con pEF-flagRIG-I (RIG-I) ó pEF-flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) fue utilizado como molde para amplificar RIG-I mediante qRT-PCR. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando GAPDH para normalizar. Las barras de cada columna representan la desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes.

Los resultados de la RT-PCR en punto final demuestran que el mRNA de RIG-I se encuentra presente en células sin tratar, sin embargo en células transfectadas con RIG-I o la dominante negativa se observa un incremento considerable y semejante en los niveles de mRNA de RIG-I y Δ RIG-I (Fig.14).

Los resultados de la PCR tiempo real obtenidos nos permiten determinar un incremento de 32.9 veces en la expresión de RIG-I en células transfectadas con el vector pEF-flagRIG-I y 38.3 veces en células transfectadas con pEF-flag Δ RIG-I con respecto al control no transfectado (Fig. 15).

Para corroborar el incremento de la abundancia relativa de la proteína RIG-I en células Huh-7 transfectadas o no con los diferentes vectores, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia, para lo cual las células fijadas y permeabilizadas, se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-RIG-I hecho en chivo (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario anti-chivo conjugado a Cy5 para finalmente realizar contratinción nuclear con DAPI. Las células se visualizaron en un microscopio confocal (Fig. 16).

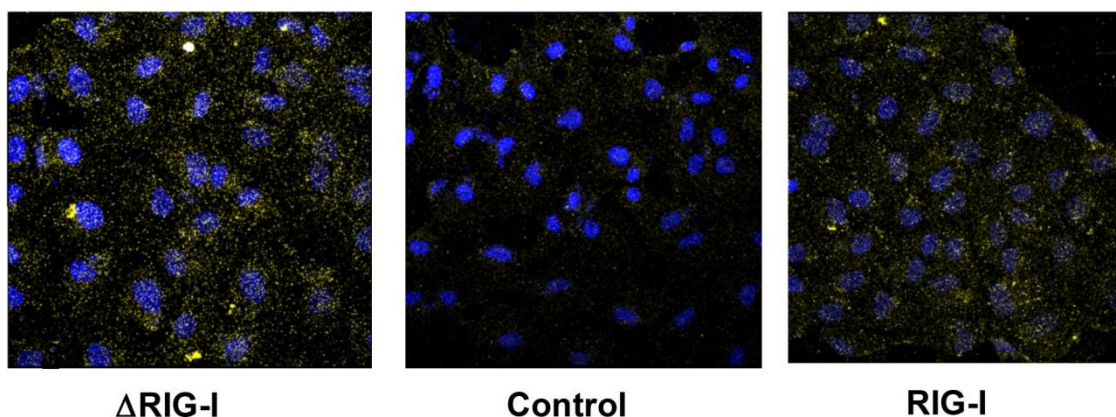


Figura 16. Inmunofluorescencia de células transfectadas los vectores pEF-flagRIG-I (RIG-I) ó pEF-flag Δ RIG-I (Δ RIG-I). Las células Huh-7 transfectadas o no con 1 μ g de los vectores se marcaron con un anticuerpo anti-RIG-I y un anticuerpo secundario conjugado a Cy5 (amarillo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y se observaron en un microscopio confocal con un objetivo de 60x. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

La señal de Cy5 en células transfectadas con respecto al control, se incrementó considerablemente, lo que indica que se encuentra presente una mayor cantidad de la proteína. En concordancia con los resultados obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real y punto final. Por otra parte, en las células sin transfectar se observa un patrón punteado distribuido en el citoplasma, mientras que en el caso de células transfectadas se observan algunos sitios de colocación con núcleo debido probablemente al efecto de la sobreexpresión.

En conjunto, los resultados obtenidos en la RT-PCR e inmunofluorescencia demuestran una transfección efectiva que se ve reflejada en el incremento de los niveles del mRNA y de la proteína RIG-I y Δ RIG-I, los cuales se consideran adecuados para observar el efecto de esta proteína sobre la replicación viral y la expresión de citocinas en respuesta a la infección por DENV.

Efecto de RIG-I en la eficiencia de replicación viral.

Para determinar si la sobreexpresión de RIG-I afecta la replicación de DENV, las células Huh-7 transfectadas fueron infectadas con DENV-2 a una MOI de 3 a las 24 h post-transfección. Después de 24 h post-infección las células se lisaron y el RNA extraído se utilizó para realizar RT-PCR con la finalidad de cuantificar los niveles del genoma viral en células infectadas, utilizando oligonucleótidos para una región que codifica para la proteína NS5 y como control de carga, se utilizaron los iniciadores de GAPDH.

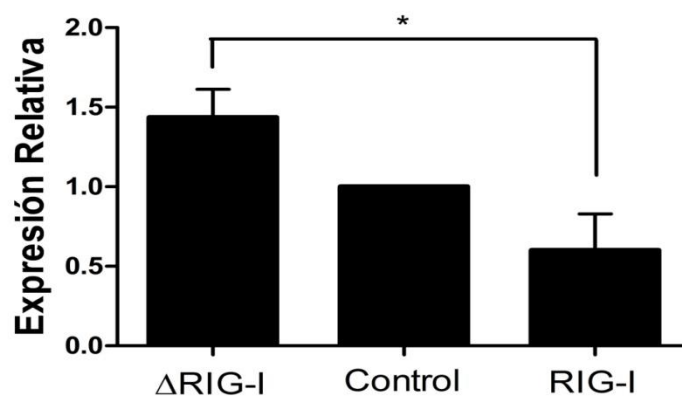


Figura 17. Acumulación de RNA viral en células transfectadas a las 24 h post-infección. Las células Huh-7 se transfectaron o no con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) y se infectaron con DENV-2 a MOI de 3. Posteriormente se extrajo el RNA total con el cual se determinaron los niveles de RNA viral mediante qRT-PCR a las 24 h post-infección. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta$ Ct utilizando GAPDH para normalizar. Las barras muestran la desviación estándar obtenida de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos de la RT-PCR en tiempo real muestran un incremento en la detección del genoma viral del 40% en células Huh-7 que expresan el dominante negativo de RIG-I (Δ RIG-I) comparado con células que solo se trataron con el reactivo de

transfección y, mientras que la sobreexpresión de RIG-I reduce aproximadamente 40% la detección del genoma del virus dengue en células Huh-7 (Fig. 17).

Para observar el efecto de la sobreexpresión o inhibición de la actividad de RIG-I sobre la producción de proteínas virales, se realizó una inmunofluorescencia de células Huh-7 transfectadas e infectadas a las 24 h post-infección utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína E del virus del dengue y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y las células se visualizaron en un microscopio confocal (Fig.18).

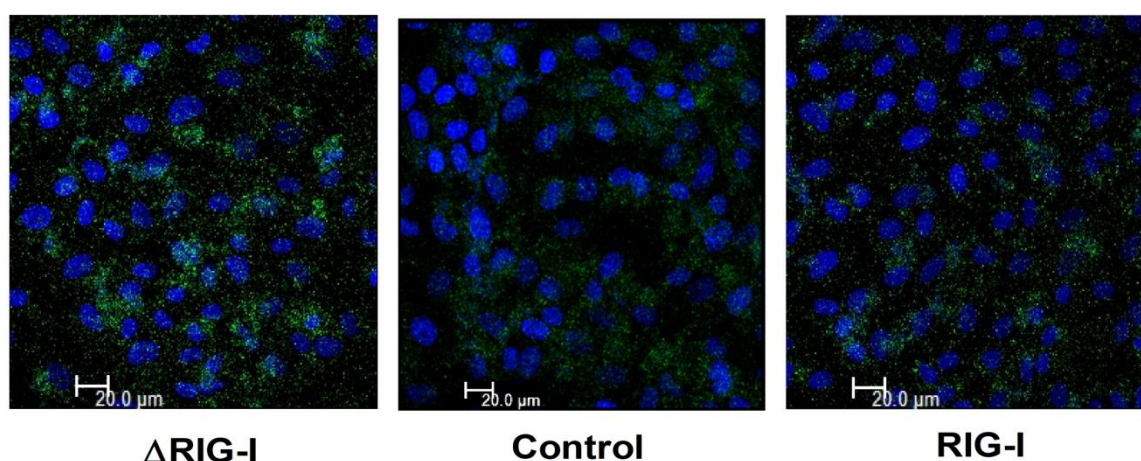


Figura 18. Inmunodetección de la proteína E en células Huh-7 transfectadas e infectadas con DENV-2. Las células Huh-7 transfectadas o no con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) e infectadas con DENV-2 a MOI de 3 se usaron para realizar ensayos de inmunofluorescencia, para lo cual, se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína viral E y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y las células se visualizaron en un microscopio confocal. La imagen es un resultado representativo de tres experimentos independientes.

El ensayo de inmunofluorescencia reveló un incremento en la producción de la proteína E en células que expresan el dominante negativo comparado con el control. En contraste, las células que sobreexpresan la versión silvestre de RIG-I muestran una menor señal de Alexa 488 comparado con células no transfectadas a las 24 h post-infección.

En conjunto los resultados obtenidos de la RT-PCR y la inmunofluorescencia muestran que la actividad de RIG-I tiene un efecto negativo sobre los niveles expresión del mRNA y la proteína E de DENV.

Paralelamente, para estudiar el efecto del virus sobre la expresión de 3 miembros de la familia de RLRs, se realizó el perfil de expresión de estas moléculas de células Huh-7 transfectadas e infectadas con el virus dengue a una MOI de 3 a las 24 horas post-transfección mediante RT-PCR en punto final, para esto se utilizaron oligonucleótidos específicos para RIG-I, MDA5 y LGP2.

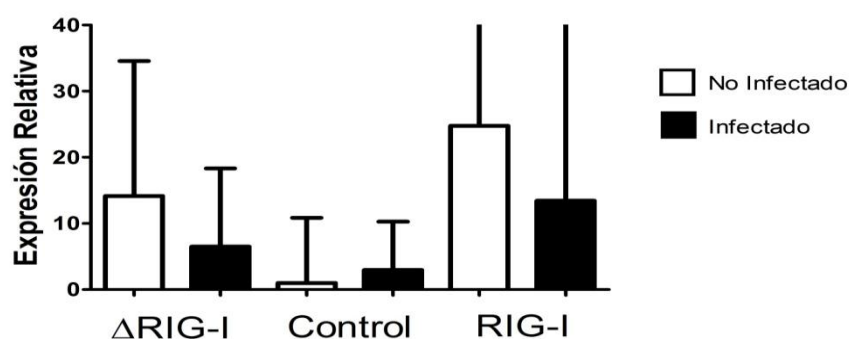


Figura 19. Perfil de expresión de RIG-I en células Huh-7 mediante qRT-PCR. La expresión de RIG-I en células transfectadas pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-FlagΔRIG-I (ΔRIG-I) e infectadas con el virus dengue se realizó mediante qRT-PCR a las 24 h p.i. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta C_t$ normalizando los datos con los amplificadores obtenidos con los iniciadores para GAPDH. Las barras de cada columna representan la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias significativas en la expresión de RIG-I en células infectadas comparado con células no infectadas (Fig. 19). En células no infectadas que expresan el dominante negativo de RIG-I (ΔRIG-I) se observó una mayor expresión de RIG-I comparado con su contraparte infectada mientras que la expresión de RIG-I en células que sobreexpresan la versión silvestre se encuentra disminuida al compararla con su contraparte no infectada.

De la misma forma se evaluó la expresión de MDA5 en células Huh-7 transfectadas e infectadas con DENV-2 (Fig. 20).

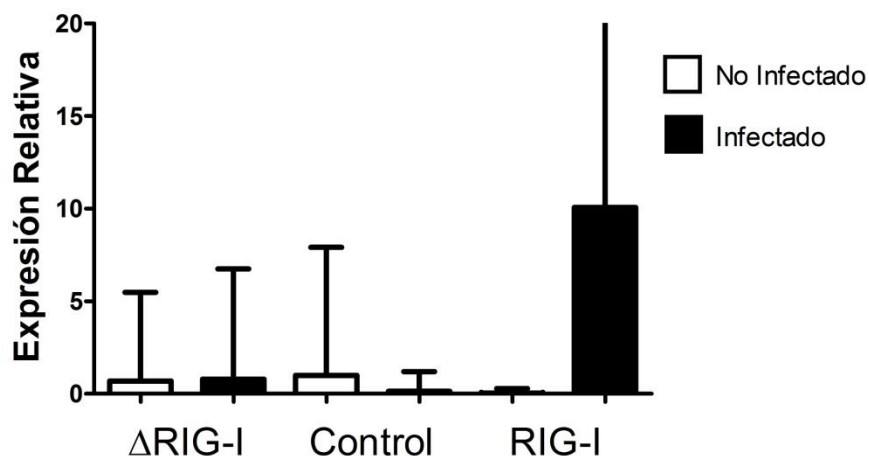


Figura 20. Perfil de expresión de MDA5 en células Huh-7 mediante qRT-PCR. Se evaluó la expresión de MDA5 en células Huh-7 transfectadas o no con pEF-flagRIG-I (RIG-I) ó pEF-flagΔRIG-I (ΔRIG-I) e infectadas o no con DENV-2 mediante qRT-PCR a las 24 h post-infección. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta C_t$ normalizando los datos con los amplificadores obtenidos con los iniciadores para GAPDH. Las barras de cada columna representan la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Los niveles de expresión de MDA5 no cambiaron significativamente en las células transfectadas con RIG-I o ΔRIG-I, sin embargo en células transfectadas con el vector RIG-I e infectadas con DENV-2 se observó una tendencia a incrementar la expresión del mRNA de MDA5. Posteriormente, de la misma manera se realizó RT-PCR para determinar los niveles de mensajero de LGP2; y de esta forma completar la evaluación de los tres RLRs.

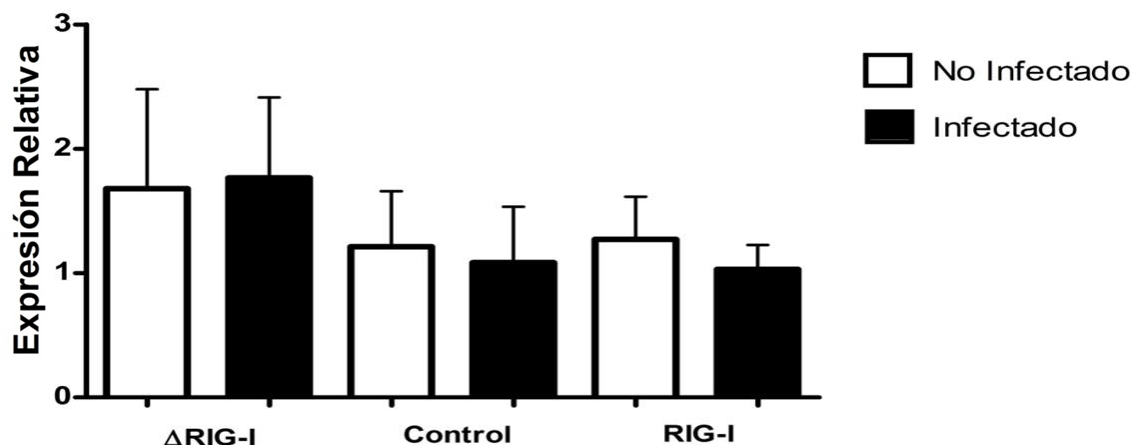


Figura 21. Perfil de expresión de LGP2 en células Huh-7 transfectadas e infectadas con DENV-2. La expresión de LGP2 en células transfectadas o no con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-FlagΔRIG-I (ΔRIG-I) e infectadas o no con DENV-2 se evaluó mediante qRT-PCR a las 24 h post-infección. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta C_t$ normalizando los datos con los amplificadores obtenidos con los iniciadores para GAPDH. Las barras de cada columna representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados de la qRT-PCR no muestran cambios significativos en la expresión de LGP2 en células infectadas comparado con células no infectadas; tampoco se detectan cambios significativos en los niveles del mRNA de LGP2 relacionados con la transfección de los vectores.

Efecto de RIG-I sobre la expresión de IFN- β en respuesta a la infección con DENV-2.

La después de la interacción de RIG-I ó MDA5 con la proteína mitocondrial MAVS, la transducción de señales bifurca, dando como resultado, por un lado, la activación de los factores de transcripción IRF-3 y 7, lo que da lugar a la expresión de IFN- β ; y por otro lado se activa el factor de transcripción NF- κ B, que induce la expresión de citocinas proinflamatorias. Para observar si la infección con DENV-2 es capaz de activar la respuesta antiviral dependiente de IRF-3 (IFN- β) ó NF- κ B (RANTES), y para determinar si la actividad de RIG-I es capaz de modular esta respuesta se evaluó la expresión del mRNA

de IFN- β y de la citocina RANTES en células Huh-7 transfectadas o no con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I), e infectadas con DENV-2, mediante RT-PCR en punto final (Fig. 22).

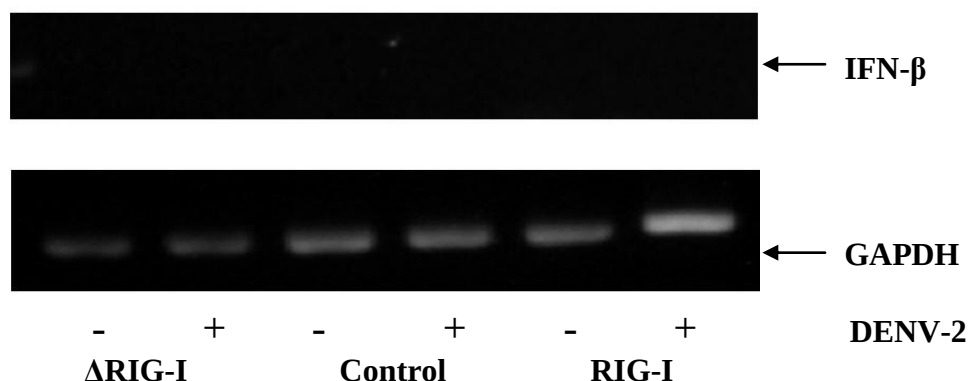


Figura 22. Expresión de IFN- β en células Huh-7 transfectadas e infectadas con el DENV-2. La expresión de IFN- β en células Huh-7 transfectadas o no con pEF-flagRIG-I (RIG-I) ó pEF-flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) e infectadas o no con el DENV-2 se evaluó mediante RT-PCR a las 24 h post-infección. Los productos de la reacción se separaron en gel de agarosa al 1.5%. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

En los resultados de la RT-PCR en punto final no se observó el amplicón de IFN- β esperado en ninguno de las condiciones (Fig. 22). En vista de que se probaron 3 diferentes pares de oligonucleótidos probados en otros estudios, los cuales amplifican perfectamente a partir de DNA genómico, pero no a partir de RNA tratado con DNAasa, se optó por realizar PCR en tiempo real utilizando una sonda TaqMan para hacer más sensible la detección. Sin embargo el resultado fue el mismo, no se detectó la inducción de IFN- β en células infectadas a pesar de que éstas se encontraban sobreexpresando RIG-I (datos no mostrados). Lo que en este punto sugería 2 posibilidades; que la cepa de DENV-2 utilizada en estos ensayos no induce o bloquea la inducción IFN- β ó una falta de respuesta por parte de las células Huh-7. Por ésto nos dimos a la tarea de obtener un control positivo de la reacción, y de demostrar el efecto de DENV-2 sobre la inducción de IFN- β . Ambos aspectos son abordados con más detalle en el siguiente objetivo de este estudio.

Mientras tanto, se prosiguió con la otra parte de este experimento. En la cual, se determinó la expresión de RANTES en células Huh-7 infectadas con DENV-2 y

transfectadas con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I), la RT-PCR muestra un incremento en la expresión de RANTES en células infectadas comparado con células no infectadas. Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos, especialmente cuando se comparó la expresión de esta molécula en células infectadas no transfectadas con respecto a las células infectadas y transfectadas con RIG-I (Fig. 23).

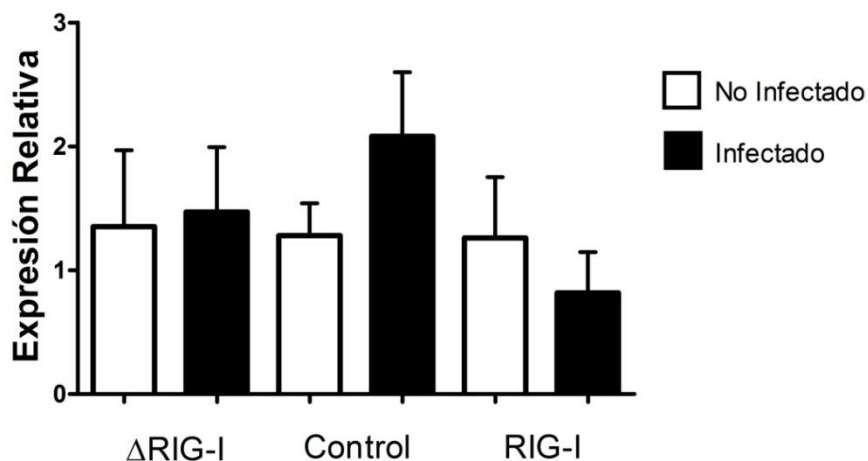


Figura 23. Perfil de expresión de RANTES en células Huh-7. Se evaluó la expresión del mRNA de la citocina RANTES en células Huh-7 transfectadas o no con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) e infectadas o no con DENV-2 a MOI de 3 a las 24h post-transfección mediante RT-PCR. Los productos de la reacción se separaron en gel de agarosa al 1.5%. Los datos se analizaron por densitometría. Las barras muestran la desviación estándar obtenida de 3 experimentos independientes.

Sin embargo, se observa la tendencia a incrementar su expresión en células infectadas no transfectadas al compararlo con células no infectadas, lo que concuerda con diferentes reportes, donde se observa que la infección con DENV-2 induce la expresión de una gran cantidad de citocinas proinflamatorias [54].

Obtención de los productos de PCR de las UTRs de DENV-2

Para demostrar que el genoma de DENV-2 posee las características necesarias para activar la vía de RLR's, y para eliminar cualquier efecto que las proteínas virales pudieran tener sobre la expresión de IFN- β , se planteó buscar la presencia de algún motivo presente en las UTR's del genoma de DENV-2 con la capacidad de inducir IFN- β . Inicialmente se planteó transfectar diferentes regiones de las UTRs de DENV-2 obtenidas mediante transcripción *in vitro* y evaluar la expresión de IFN- β mediante qRT-PCR; Así mismo se planteó acortar estas regiones hasta el punto donde su capacidad de inducir IFN- β se pierda. Dicho ensayo serviría también como control positivo de inducción ya que se ha observado que el RNA obtenido mediante transcripción *in vitro* induce IFN- β a través de RIG-I. Para lo cual, inicialmente se delimitaron las regiones de la siguiente manera:

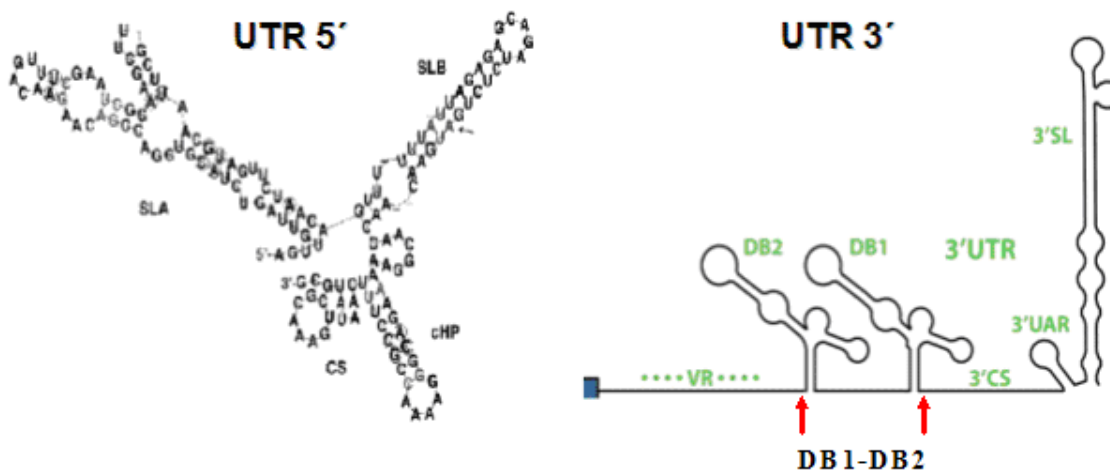


Figura 24. Delimitación de las diferentes regiones de las UTRs. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la UTR 5'+CS, la UTR 3' completa y la región DB1-DB2 del genoma de DENV-2 [53].

Basándonos en la secuencia del replicón de DENV-2, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento que abarca desde la 5'UTR hasta la secuencia CS y que consiste de 150 nt. Otro par de oligonucleótidos para amplificar la UTR 3' completa (453 nt) y otro para amplificar un fragmento que abarca desde la región DB1 hasta la región DB2 (150 nt). Cabe mencionar que estos oligonucleótidos contienen el promotor de la polimerasa T7, los cuales se utilizaron para obtener los diferentes RNAs a partir de una reacción de transcripción *in vitro*.

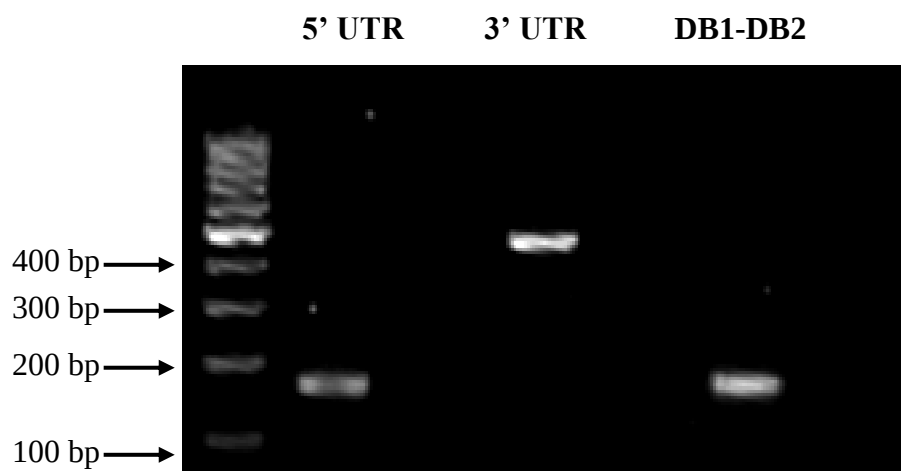


Figura 25. Obtención de las diferentes regiones de las UTRs del genoma de DENV-2. La UTR 5', la UTR 3' y la región DB1-DB2 y del genoma de DENV-2 se amplificaron mediante PCR utilizando el replicón de DENV-2 como molde. Los productos de cada reacción se separaron en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Después de obtener el amplicón esperado para cada una de las regiones, se purificaron las bandas y se secuenció la UTR 3'. La secuenciación reveló un producto de 447 nucleótidos, es decir tres nucleótidos más corto del tamaño esperado, con un 98% de identidad con algunos errores en los primeros diez nucleótidos de la secuencia, lo cual es un efecto frecuente en las primeras bases secuenciadas.

Transcripción *in vitro* de las UTRs de DENV-2.

El producto de la amplificación purificado se utilizó para la obtención de cada uno de los de los RNA's a partir de una reacción de transcripción *in vitro* (Fig. 26).

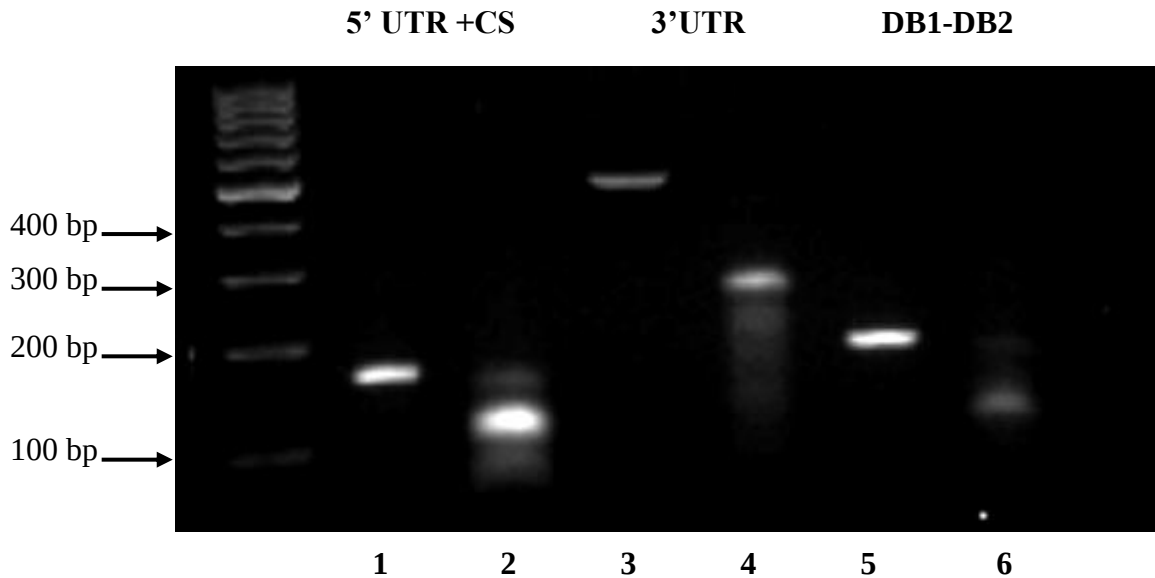


Figura 26. Transcripción *in vitro* de las UTRs del genoma de DENV-2. A partir del producto de PCR purificado se realizó la transcripción *in vitro* de las UTRs a partir del genoma de DENV-2. Los productos de la transcripción se trataron con DNasa y se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden a los DNA molde con los cuales se obtuvieron los transcritos. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden al transcrito obtenido para la UTR 5', la UTR 3' y la región DB1-DB2 respectivamente.

Los transcritos correspondientes a la región 5' completa, la región 3' completa y la región DB1-DB2, los cuales se separaron en gel de agarosa al 2%, muestran una migración electroforética de alrededor de la mitad del tamaño de su DNA molde de doble cadena, a partir del cual se sintetizaron. Este hecho es lo esperado para RNAs transcritos *in vitro*.

Evaluación de la expresión de IFN- β en respuesta a la transfección de las UTR's del genoma de DENV-2.

Para evaluar la capacidad de las UTRs del genoma de DENV-2 de activar el promotor de IFN- β en ausencia de proteínas virales, las células Huh-7 se lipotransfectaron con los transcritos obtenidos bajo el esquema de transfección antes mencionado con el objetivo de estimular la vía de los RLRs. En breve, se transfectó individualmente la 5'UTR con grupo 5'ppp expuesto (5'UTRppp) ó con una estructura cap m7GpppAmp (5'UTRcap) para bloquear el reconocimiento del grupo trifosfato por RIG-I. Así mismo, se transfectó la UTR 3'ppp y la región DB1-DB2ppp; por otra parte se transfectó en conjunto la 5' UTRppp y la 3' UTRppp ya que se ha demostrado que esta tienen la capacidad de hibridizar en solución, y por lo tanto de formar dsRNA [53].

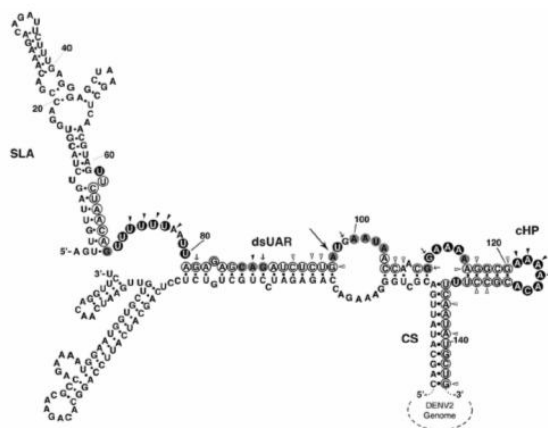


Figura 27. Interacción de las UTRs del virus dengue en solución. La interacción de la UTR'5 con la UTR 3' a través de los elementos UAR y CS facilitan la circularización del genoma de DENV [53].

Posteriormente las células transfectadas con la regiones se lisaron con trizol a las 6, 12 y 24 h post-transfección y con el RNA extraído se realizó RT-PCR para evaluar la expresión de IFN- β .

Para corroborar que la transfección de las células se llevó a cabo eficientemente, se extrajo RNA total de células transfectadas a las 6 h post-transfección y se realizó una retrotranscripción con el iniciador reverso utilizado para obtener cada región. Con el cDNA obtenido se realizó una PCR y los productos se separaron en gel de agarosa al 1.5% (Fig. 28).

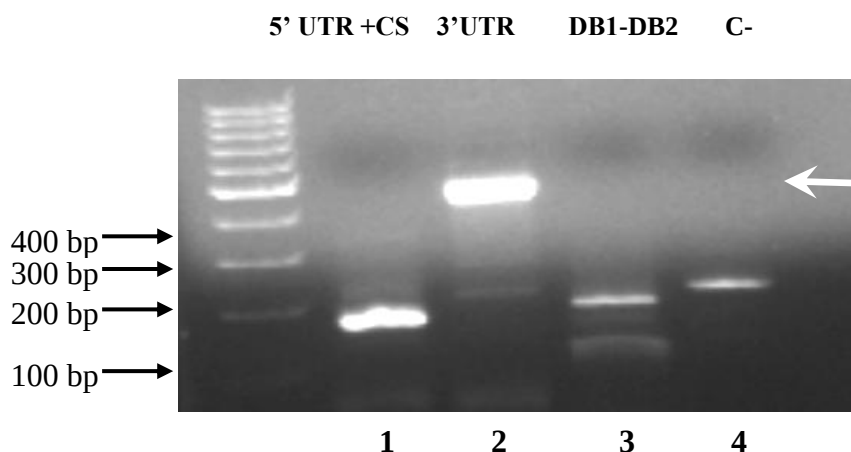


Figura 28. Detección de las UTRs del genoma de DENV-2 transfectadas en células Huh-7. Las células Huh-7 transfectadas con cada una de las UTRs se trataron con trizol para extraer RNA total a las 6 h post-transfección. Los RNAs obtenidos se utilizaron para amplificar mediante RT-PCR las regiones transfectadas. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa y fueron teñidos con bromuro de etido. Se logró amplificar la 5' UTR+CS (carril 1), 3' UTR (carril 2) y DB1-DB2 (carril 3), a partir de RNA total de células Huh-7 transfectadas con su respectiva región. Se observa la ausencia del amplificado de 453 bp correspondiente a la 3' UTR en células no transfectadas (C-).

Como se puede observar en la figura 28, se logró amplificar la UTR 5' y 3' así como la región DB1-DB2 a partir de RNA total de células transfectadas, con lo que se demuestra que los transcritos fueron transfectados con éxito en células Huh-7 bajo las condiciones utilizadas.

Expresión de IFN- β en respuesta a la transfección de las UTRs

Para estudiar la capacidad de cada una de las UTRs de activar el promotor de IFN- β , se realizó un ensayo de RT-PCR en punto final con RNA extraído de células Huh-7 transfectadas con las diferentes regiones a las 6, 12 y 24 h post-transfección. Cabe mencionar que la UTR 5' se utilizó con estructura cap o no en el extremo 5'. Además se transcribió una región de 450 nt del mRNA del gen GAPDH con y sin estructura cap como control no relacionado.

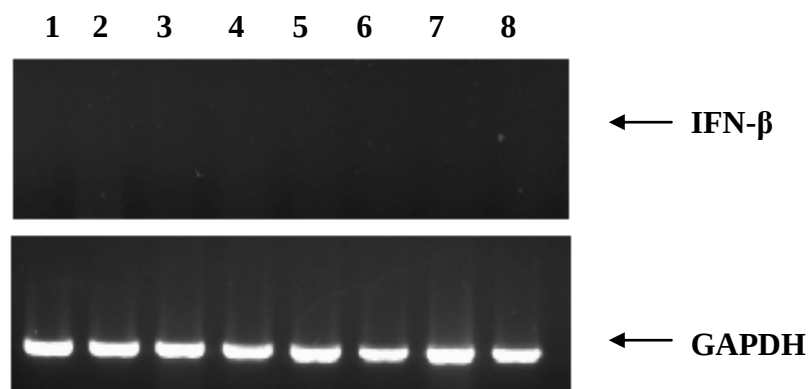


Figura 29. Expresión de IFN- β en células Huh-7 transfectadas con las diferentes regiones de las UTRs de DENV-2. Con el RNA extraído de células Huh-7 transfectadas con la 5' UTR cap (carril 1), 5' UTR ppp (carril 2), 3' UTR (carril 3), 3'UTR transfectada en conjunto con la 5' UTR (carril 4), región DB1-DB2 (carril 5), GAPDH T7 cap (carril 6), GAPDH T7 ppp (carril 7), o no transfectadas (carril 8); se realizó RT-PCR para evaluar los niveles de mRNA de IFN- β y GAPDH como control de carga.

Se realizaron un gran número experimentos, sin embargo no se observó inducción de IFN- β en respuesta a la transfección de las UTRs en células Huh-7 (Fig. 29). Cabe mencionar que en algunos casos aislados se detectaron niveles mínimos de IFN- β pero los niveles detectados fueron muy bajos y con poca reproducibilidad.

Es importante mencionar que no se detectó IFN- β en células Huh-7 infectadas con DENV-2, lo que sugería un problema en el método de detección, un efecto inhibitorio por parte de DENV-2, ó una falta de respuesta propia de la línea celular. Para abordar este problema se realizó una RT-PCR en tiempo real utilizando la sonda TaqMan para detectar mRNA de IFN- β . Sin embargo, el resultado fue el mismo, por lo que se decidió estimular las células Huh-7 mediante la transfección con un fuerte inductor de IFN- β , poly I:C, el cual funciona a través la activación de los RLRs.

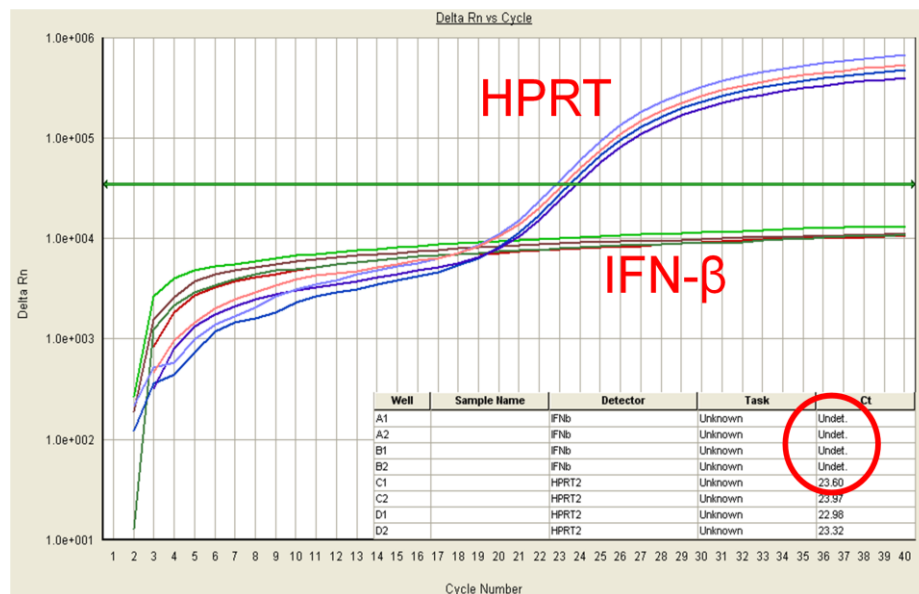


Figura 30. Expresión de IFN- β en células Huh-7 estimuladas con poly I:C. Las células Huh-7 se estimularon mediante la transfección de Poly I:C, a las 24 h post-transfección se extrajo RNA total y se realizó una qRT-PCR para amplificar el mRNA de IFN- β . En la imagen se muestra la curva de amplificación del gen constitutivo HPRT y la ausencia de amplicon para IFN- β .

Como se puede observar en la figura 30, las células Huh-7 no expresaron IFN- β en respuesta a la transfección con Poly I:C, de tal manera que se decidió inducir la expresión de IFN- β en células Huh-7 con LPS que activa la vía de TLR4 y así se estimula la expresión de IFN- β mediante dicha ruta, sin embargo tampoco se pudo detectar el amplificado de IFN- β (datos no mostrados).

Dado que la infección con DENV-2, ó los tratamientos con Poly I:C, ó LPS (Lipopolisácarido) no inducen la expresión de IFN- β en células Huh-7; y sumado a que las sondas TaqMan comerciales ofrecen la máxima sensibilidad disponible en el mercado para ensayos de qRT-PCR, es muy probable que las células Huh-7 tengan una vía de inducción de IFN- β defectuosa. Para determinar que la ausencia de IFN- β no se debe a un problema con el método de detección, si no más bien a una falta de respuesta de la línea celular Huh-7, se estimularon células HeLa con Poly I:C intracelular y extracelular, LPS, y 2 serotipos diferentes del virus dengue y se realizaron ensayos de RT-PCR en punto final para amplificar el mRNA de IFN- β .

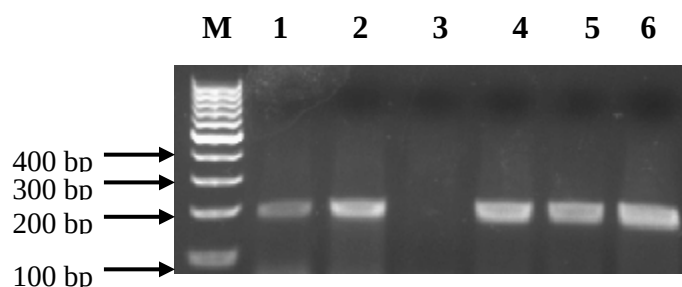


Figura 31. Expresión de IFN- β en células HeLa estimuladas con distintos inductores. Las células HeLa no infectadas (carril 6) ó infectadas con DENV-2 (carril 1) ó DENV-4 (carril 2); o tratadas con LPS (carril 3) ó Poly I:C (carril 4 y 5); se lisaron con trizol y el RNA obtenido se utilizó para amplificar el mRNA de IFN- β por RT-PCR. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. El carril M corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb.

Dado que no se observó la inducción de IFN- β con poly I:C ó LPS en células Huh-7, decidimos validar nuestro sistema de amplificación en una línea celular diferente. Los ensayos de RT-PCR en punto final, en los cuales se observa en la figura 31 el amplificado esperado para IFN- β , el cual se detectó eficientemente en células infectadas con DENV-2 ó DENV-4, también se detecta IFN- β en células estimuladas con poly I:C, incluso se detectan niveles basales de IFN- β en células no estimuladas. Lo anterior, demuestra que el método de detección es eficiente y también sugiere que efectivamente las células Huh-7 no expresan IFN- β en respuesta a los diferentes estímulos probados.

Efecto de RIG-I sobre la replicación viral y la producción de IFN- β .

En vista de los resultados obtenidos, se tomó la decisión de evaluar la respuesta de RLR's en otra línea celular, se eligió la línea celular humana U937, los cuales son monocitos que se diferencian a macrófagos por la adición de PMA, ya que estas células

representan blancos primarios de la infección con DENV y, no poseen un defecto en la inducción de IFN- β .

Por lo tanto para observar si DENV-2 es capaz de inducir IFN- β en células U937 y para determinar si la actividad de RIG-I es capaz de modular esta inducción, así como la acumulación de RNA viral, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real a partir del RNA extraído de células U937 diferenciadas, que fueron transfectadas o no con con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) e infectadas con DENV-2. Inicialmente se realizó la detección del genoma viral para medir el efecto que tiene RIG-I sobre la acumulación del RNA de DENV-2 (Fig. 32).

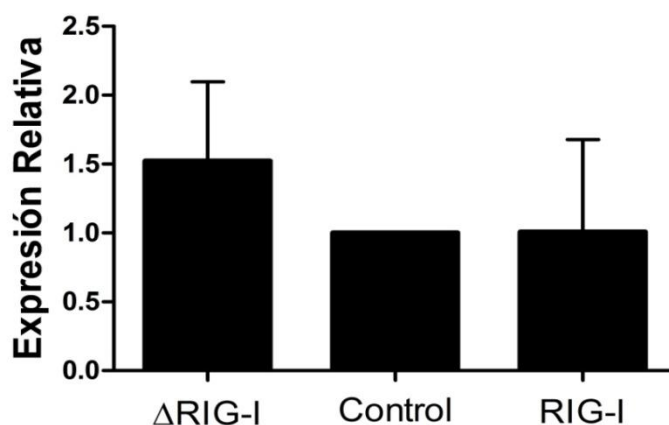


Figura 32. Detección del genoma viral a las 24 h post-infección. Las células U937 transfectadas con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) se infectaron con DENV-2 a MOI de 3, posteriormente se extrajo RNA total con el cual se determinaron los niveles de RNA viral mediante qRT-PCR. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta$ Ct utilizando GAPDH para normalizar. Las barras de cada columna representan la desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 32, no se detectó ninguna modificación significativa en los niveles de RNA viral en células U937 transfectadas con el dominante negativo de RIG-I comparado con el control, tampoco en células que sobreexpresan RIG-I. Sin embargo se observó una tendencia a la disminución de éste, tanto en el control como en las células transfectadas con el plásmido que codifica para RIG-I, a diferencia de las células transfectadas con el dominante negativo. Posteriormente, para verificar los resultados

obtenidos mediante qRT-PCR, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia donde se detectó la proteína viral E de la forma antes descrita para las células Huh-7 (Fig. 33).

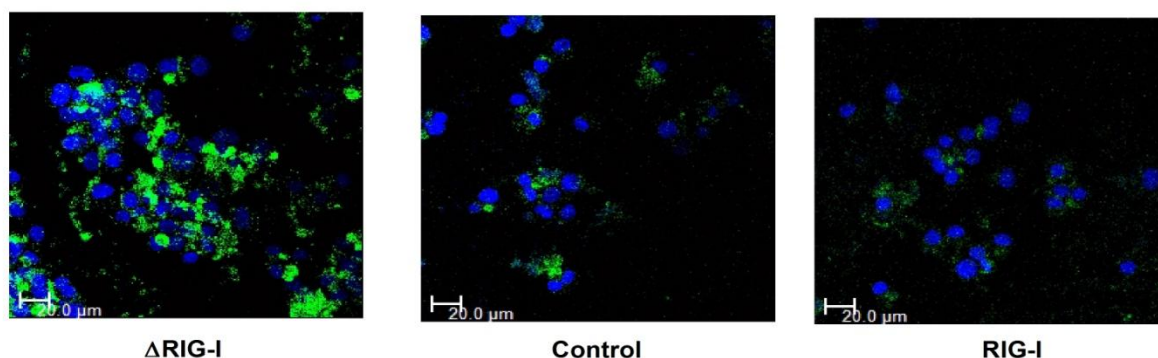


Figura 33. Inmunodetección de la proteína viral E en células U937 transfectadas e infectadas con DENV-2. Las células U937 diferenciadas transfectadas o no con pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-FlagΔRIG-I (ΔRIG-I) e infectadas con DENV-2 a MOI de 3 se usaron para realizar ensayos de inmunofluorescencia, para lo cual se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la proteína E de DENV-2 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde) Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y las células se visualizaron en un microscopio confocal. La imagen es un resultado representativo de tres experimentos independientes.

Como se aprecia en la figura 33, se observó una mayor señal de Alexa 488 en células U937 transfectadas con ΔRIG-I comparado con el control y de acuerdo con los resultados de la qRT-PCR. Los niveles de proteína E no muestran cambios importantes en células que sobreexpresan RIG-I comparado con el control. Los resultados mostrados sugieren que la inhibición de la actividad de RIG-I en células U937 vuelve a estas células más permisivas a la infección con DENV-2. Posteriormente se evaluó la expresión de IFN-β mediante qRT-PCR en células U937 transfectadas con ΔRIG-I ó RIG-I e infectadas con DENV-2 (Fig. 34).

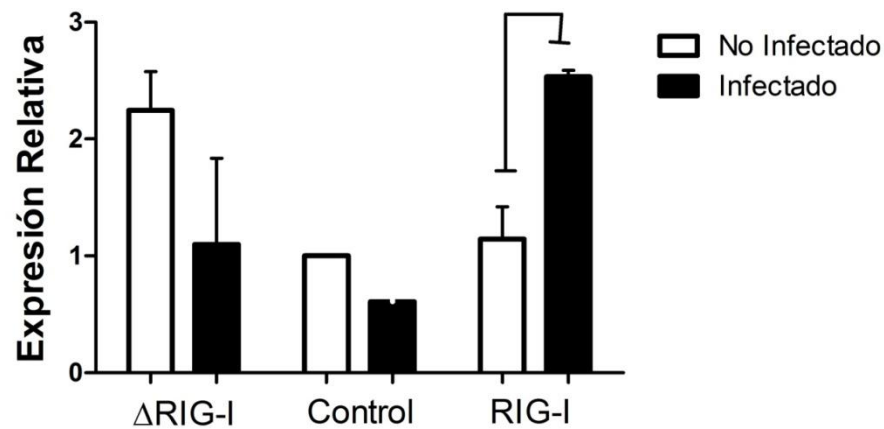


Figura 34. Expresión de IFN- β en células U937 transfectadas e infectadas DENV-2. Las células U937 diferenciadas transfectadas o no pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) se infectaron con DENV-2 y 24 h post-infección se realizó qRT-PCR utilizando sondas TaqMan para la amplificación del mRNA de IFN- β y HPRT. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta$ Ct utilizando HPRT como gen constitutivo. Las barras de cada columna representan la desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes.

Debido a que las células U937 se diferencian a macrófagos, expresan niveles basales de IFN- β , sin embargo los niveles de expresión de esta citocina fueron menores en células infectadas con DENV-2 comparado con células no infectadas (Fig. 34). El mismo efecto se observa en células U937 transfectadas con el dominante negativo de RIG-I. En contraste se observó un incremento de 2.5 veces en la expresión de IFN- β en células infectadas que sobreexpresan RIG-I. Los resultados sugieren que DENV-2 no induce o bloquea la inducción de IFN- β en células U937. Por otra parte el incremento modesto en la expresión de IFN- β en células que sobreexpresan RIG-I sugiere que alguna de las especies de RNA producidas durante la replicación viral es capaz de activar a RIG-I. Para estudiar más a fondo la inducción de IFN-I, se decidió también evaluar la expresión de IFN- α mediante qRT-PCR (Fig. 35).

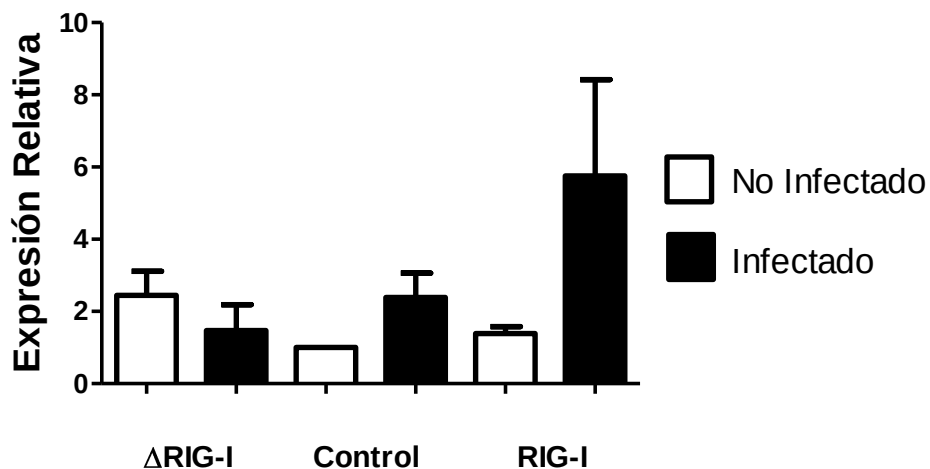


Figura 35. Expresión de IFN- α en células U937 transfectadas e infectadas DENV-2. Las células U937 diferenciadas transfectadas o no pEF-FlagRIG-I (RIG-I) ó pEF-Flag Δ RIG-I (Δ RIG-I) se infectaron con DENV-2 y 24 h post-infección se realizó qRT-PCR para la amplificación del mRNA de IFN- β . Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta$ Ct utilizando GAPDH como gen constitutivo. Las barras de cada columna representan la desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes.

Se observó un pequeño incremento de 2.3 veces en los niveles del mRNA de IFN- α en células U937 infectadas con DENV-2 comparado con células no infectadas. Por otra parte las células U937 transfectadas con Δ RIG-I e infectadas con DENV-2 mostraron una menor expresión de IFN- α comparado con células transfectadas con Δ RIG-I pero no infectadas. Además las células U937 transfectadas con RIG-I e infectadas con DENV-2 mostraron un incremento de 5.7 veces en la expresión de IFN- α comparado con células no infectadas, lo que en conjunto sugiere que RIG-I es capaz de activar la señalización que conduce a la inducción de IFN- α en respuesta a la infección por DENV-2.

Posteriormente se evaluó la expresión de los RLRs en células U937 infectadas con DENV-2 mediante qRT-PCR (Fig. 36).

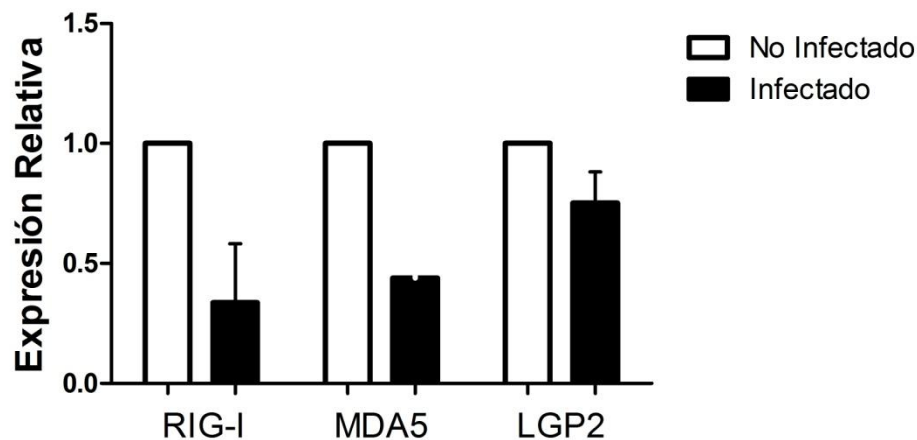


Figura 36. Perfil de expresión de RLRs en células U937 infectadas con DENV-2. Las células U937 se infectaron o no con DENV-2 a una MOI de 3 por 24 h y posteriormente se aisló el RNA total, a partir del cual se evaluó la expresión de RIG-I, MDA5 y LGP2 mediante qRT-PCR. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando GAPDH como gen constitutivo. Las barras de cada columna representan la desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes.

Los resultados mostraron una disminución en los niveles del mRNA de RIG-I, MDA5 y LGP2 en células U937 infectadas con DENV-2 comparado con células no infectadas, lo que correlaciona con la disminución en los niveles del mRNA de IFN- β debido a que RIG-I, MDA5 y LGP2 son genes inducibles por IFN- β .

La falta de inducción de IFN- β en células U937 infectadas con DENV-2, sumado a la disminución de la expresión de los tres RLR, sugiere que DENV-2 no induce ó inhibe la inducción de IFN- β . Con el objetivo de demostrar que las células U937 son capaces de inducir IFN- β normalmente en respuesta a dsRNA citosólico, y para demostrar que la infección con DENV-2 es capaz de regular negativamente la inducción de IFN- β , se realizó un experimento preliminar donde se infectaron células U937 durante 24 h para después ser transfectadas con Poly I:C por 6 h con la finalidad de inducir la activación de IRF-3 mediante la vía de los RLRs y la transcripción concomitante de IFN- β . En dicho experimento se logro observar una fuerte inducción de IFN- β en células U937 transfectadas con Poly I:C pero no infectadas, mientras que las células U937 infectadas con DENV-2 y

transfectadas con Poly I:C perdieron en gran medida la capacidad de responder a dicho estímulo. Lo que sustenta la idea de que DENV es capaz de inhibir la activación de IRF-3.

Expresión de IFN- β en células U937 transfectadas con las UTR's de DENV-2.

Finalmente, ya que contábamos con un sistema que si nos permite estudiar la inducción de IFN- β ; se decidió proseguir con la búsqueda de algún motivo o secuencia presente en las UTRs del genoma de DENV-2 capaz de activar la inducción de IFN- β . Sin embargo, durante la realización de este proyecto Schlee y cols. [55], reportaron que el RNA de cadena sencilla no es suficiente para activar a RIG-I ya que se demostró que la transcripción *in vitro* genera productos inespecíficos que podrían potencialmente generar dsRNA. Cabe mencionar que en la gran mayoría de los estudios previos al reporte mencionado, donde se probaban ligandos de RIG-I se utilizaba RNA transcrito *in vitro*, por lo que las conclusiones obtenidas en esos estudios necesitan ser re-evaluadas. Teniendo en cuenta lo anterior, se prosiguió a realizar la metodología planteada conociendo las implicaciones que pudieran tener los resultados. Para esto se transfectaron los RNAs correspondientes a la 5'UTRppp, 5'UTRcap, 3'UTRppp, DB1-DB2ppp, GAPDHppp y GAPDHcap, de la forma descrita anteriormente en células Huh-7 y se evaluó la expresión de IFN- β a las 24 h post-transfección mediante RT-PCR en tiempo real.

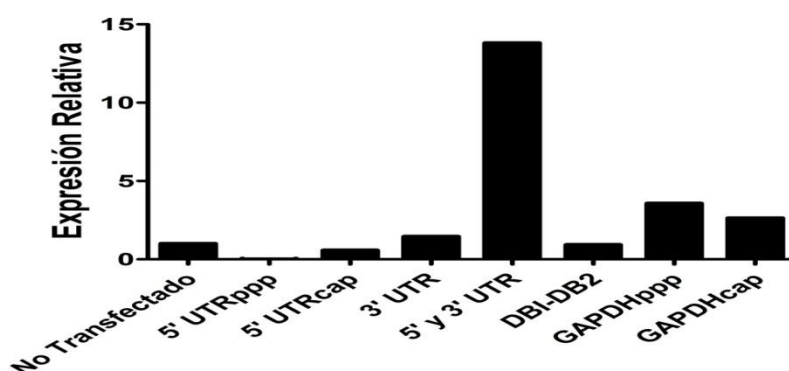


Figura 37. Inducción de IFN- β por los diferentes fragmentos de las UTRs del genoma de DENV-2. Las diferentes regiones fueron obtenidas por PCR y transcritas *in vitro*, posteriormente estas fueron transfectadas en células U937 y se extrajo RNA total a las 24 h post-transfección con el cual se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real para evaluar la expresión de IFN- β . Los datos fueron analizados por el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando HPRT como gen constitutivo.

Los resultados mostraron un incremento de más de 10 veces en la expresión de IFN- β en células U937 transfectadas con la UTR 5' y 3' hibridadas en solución, mientras que el resto de las regiones probadas no estimularon el promotor de IFN- β . Estos concuerdan con lo que se conoce sobre las características necesarias del RNA para la activación de RIG-I, ya que la transfección de la UTR 5' y 3' hibridadas (condición en la cual existe una mayor proporción de dsRNA) fue la única condición capaz de activar de forma importante el promotor de IFN- β .

Evaluación la activación de RIG-I y MAVS en respuesta a la infección con DENV-2.

Por lo mencionado anteriormente, se decidió demostrar la interacción entre RIG-I y el genoma de DENV-2 mediante inmunoprecipitación de RNA. Lo que nos diría si el genoma de DENV-2 posee las características moleculares necesarias para unirse a RIG-I. Para esto, se transfectaron células Huh-7 con el vector de RIG-I fusionado a una etiqueta FLAG, a las 24h post-transfección las células se infectaron con DENV-2, y a las 24 h post-infección las células se recolectaron y lisaron pasivamente. El extracto ribonucleoproteico obtenido se incubó con un anticuerpo anti-FLAG unido a perlas de agarosa, posteriormente se inmunoprecipitaron los complejos ribonucleoproteico. El RNA inmunoprecipitado fue convertido en cDNA utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento correspondiente a la región NS5 de DENV-2, para llevar a cabo la RT-PCR en punto final (Fig. 37).

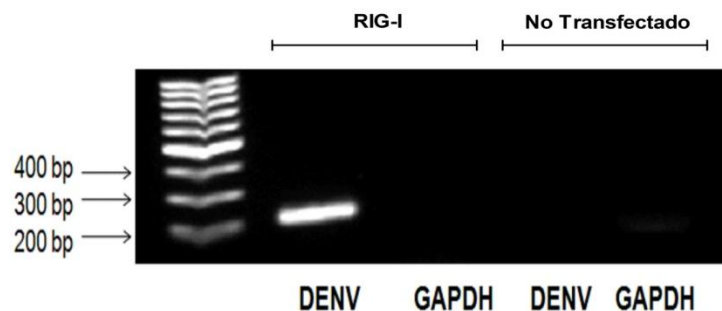


Figura 38. Inmunoprecipitación de RNA. Células Huh-7 transfectadas con el vector de pEF-flag-RIG-I wt fueron infectadas con DENV-2 a las 24 h post-transfección. Los extractos ribonucleoproteicos se incubaron con un anticuerpo anti-flag unido a perlas de agarosa por 6 h. el RNA se inmunoprecipitó por centrifugación y se lavo extensivamente. El RNA total fue extraído de las perlas con trizol y convertido en cDNA para realizar la amplificación de un fragmento del genoma de DENV-2 correspondiente a la región NS5 y del mRNA de GAPDH como RNA no relacionado. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etido. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

Después de separar los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se observó el amplicon esperado correspondiente a DENV-2 en células transfectadas con el vector de RIG-I pero no en células sin transfectar, lo que sugiere RIG-I recombinante es capaz de inmunoprecipitar al menos un fragmento del genoma de DENV-2 que contiene la región NS5, por lo que se sugiere que se este inmunoprecipitando el genoma completo o algún intermediario producido durante el ciclo replicativo. Por otro lado se demostró que RIG-I no fue capaz de interaccionar con el mRNA de GAPDH debido a que no fue posible amplificar dicho mRNA al utilizar oligonucleótidos específicos para éste. Cabe mencionar que la capacidad de un RNA de unirse a RIG-I no necesariamente correlaciona con la capacidad de activar el dominio de ATPasa de RIG-I o de inducir IFN- β [56]. Por lo tanto para determinar si RIG-I y/o MDA5 activan la transducción de señales durante la infección con DENV-2 se decidió estudiar el siguiente paso canónico en la vía de señalización de los RLRs.

Es ampliamente aceptado el modelo en el cual RIG-I y MDA5 sufren un cambio conformacional después de la unión con sus respectivos ligandos, lo que libera y expone el dominio CARD. El dominio CARD expuesto de RIG-I y MDA5 es capaz de interaccionar con el dominio CARD de la proteína mitocondrial MAVS, esta interacción representa el

siguiente paso de la vía después de la detección del RNA viral. Mediante ensayos de inmunofluorescencia un estudio reveló que MAVS sufre un fenómeno al cual los autores denominan como “Redistribución”, en el cual MAVS, cuya distribución es predominantemente citoplasmática en células no infectadas, forma un patrón punteado durante la infección con el virus de la encefalomiocarditis (EMCV), Influenza, Virus Sindbis (SV) (Figura 42), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la estomatitis vesicular (VSV) o por la transfección de RNA trifosfato [57]. Dicha redistribución de MAVS correlaciona con su activación. De tal manera que para observar si la infección con DENV-2 es capaz de inducir la redistribución de MAVS, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células Huh-7 y U937 infectadas con DENV-2. Para esto se marcó indirectamente MAVS con Alexa 488, se tiñeron las mitocondrias con Mitotracker DeepRed y lo núcleos con DAPI (Fig. 38).

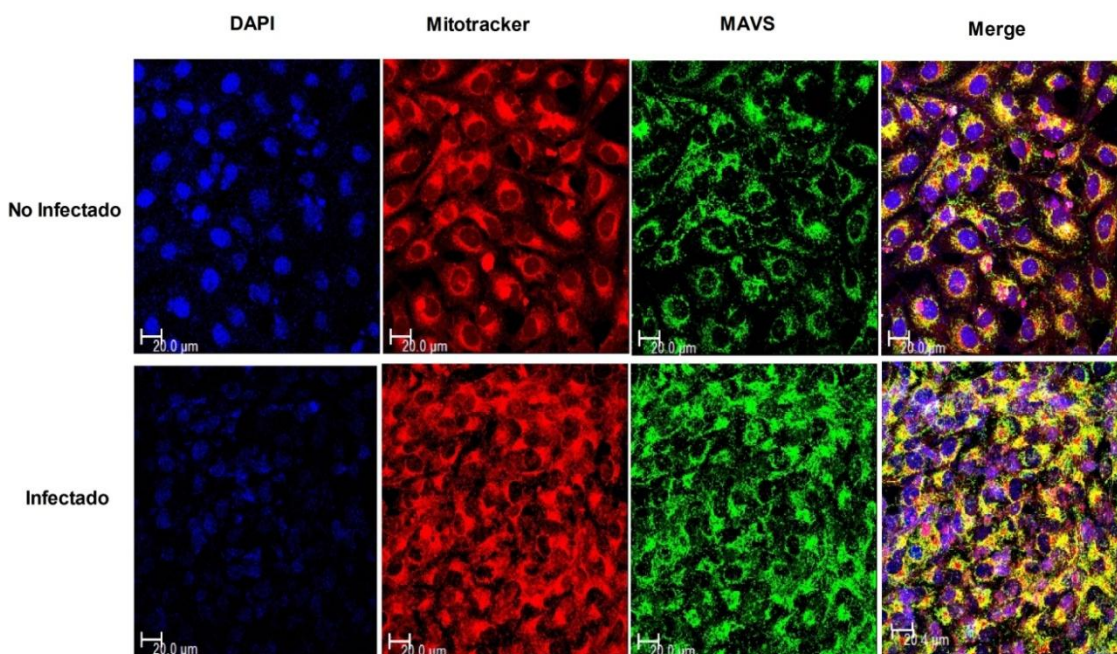


Figura 39. Distribución de MAVS en células Huh-7 infectadas con DENV-2. Las células Huh-7 fueron infectadas con DENV-2 durante 24 h. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído y se marcó la proteína MAVS con un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, se tiñeron las mitocondrias con Mitotracker deep red y los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las células se visualizaron en un microscopio confocal. La imagen es un resultado representativo de tres experimentos independientes.

En los ensayos se logró observar una distribución predominantemente citoplásmica de MAVS en células Huh-7 no infectadas, la cual colocaliza con la señal de Mitotracker. En células Huh-7 infectadas con DENV-2 se observó un cambio en el patrón de distribución de la señal de Mitotracker, el cual se volvió más difuso (Fig. 38), sin embargo, no se observó la redistribución característica de MAVS, lo cual se ha observado en otros estudios como un patrón punteado[57]. Lo anterior sugiere que en las células Huh-7 la vía de los RLRs no se activa ante la infección con DENV-2.

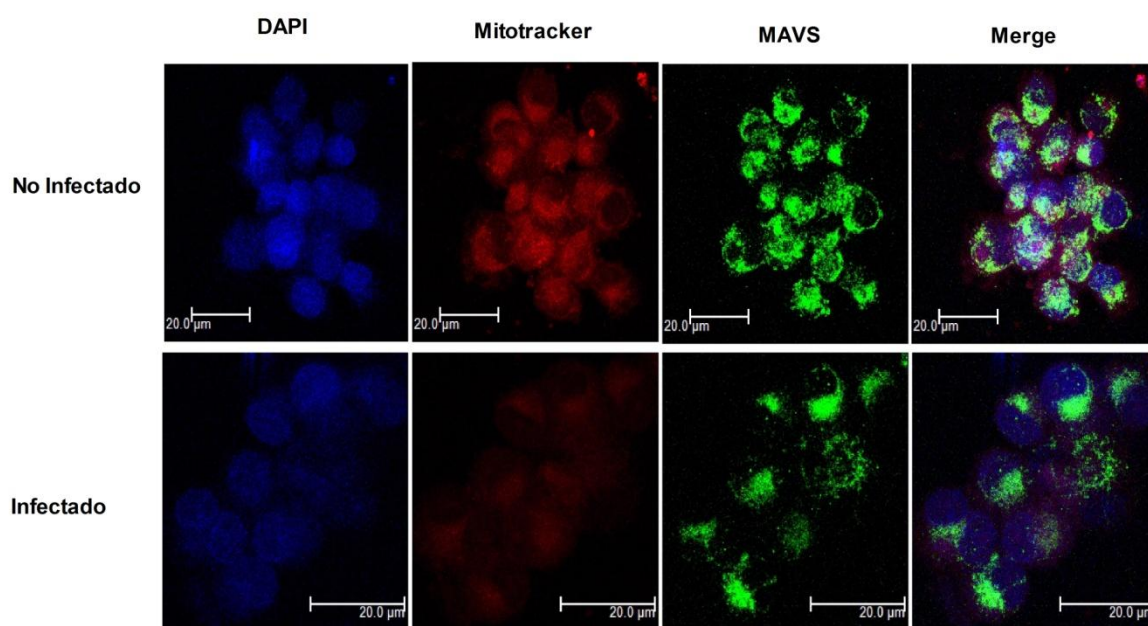


Figura 40. Distribución de MAVS en células U937 infectadas con DENV-2. Las células U937 fueron infectadas con DENV-2 durante 24 h. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído y se marcó la proteína MAVS con un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, las mitocondrias se tiñeron con Mitotracker deep red y los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las células se visualizaron en un microscopio confocal.

Al igual que en células Huh-7, en las células U937 no infectadas, MAVS mostró una distribución predominantemente citoplásmica que colocaliza con la señal de Mitotracker. Sin embargo a diferencia de lo observado en células Huh-7, en células U937 infectadas con DENV-2, la señal correspondiente a la proteína MAVS se encontró agrupada principalmente en un foco perinuclear o un patrón punteado perinuclear, observándose una

disminución considerable de la cantidad de MAVS citoplásmica. A pesar de que la señal de mitotracker se encontró disminuida en células infectadas con DENV-2, el patrón de distribución de éstas no se modificó notablemente, es decir en células infectadas no toda la señal de mitotracker se agrupa en el mismo foco perinuclear que la señal de MAVS, si no que aún se observan mitocondrias distribuidas homogéneamente en el citoplasma. Interesantemente, un gran porcentaje de estas mitocondrias citoplásmicas de células U937 infectadas con DENV-2 muestran poca o nula señal de MAVS. Es decir, en células no infectadas virtualmente todas las mitocondrias contienen MAVS, mientras que en células infectadas la mayor cantidad de MAVS se agrupa sólo en una cierta cantidad de mitocondrias. Lo anterior en conjunto muestra que en efecto DENV-2 induce la redistribución de esta proteína en células U937, lo que sugiere que la vía de RLRs se encuentra activa, al menos hasta el nivel de MAVS.

Debido a que la proteína MAVS se observó redistribuida en células U937 infectadas con DENV-2, nos pareció de gran interés saber si el patrón de distribución RIG-I también se modificaba en la infección con DENV-2. Para abordar esto, se infectaron células U937 con DENV-2 de la forma antes descrita y se realizaron ensayos de inmunofluorescencia.

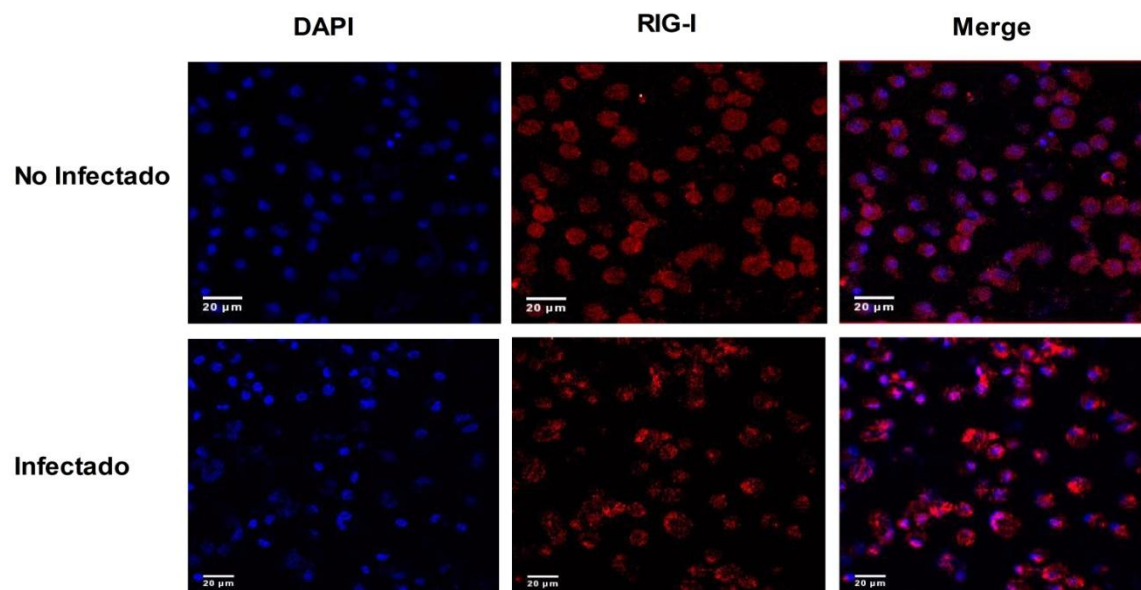


Figura 41. Distribución de RIG-I en células U937 infectadas con DENV-2. Las células U937 fueron infectadas con DENV-2 durante 24 h. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído y se marcó la proteína RIG-I con un anticuerpo polyclonal y un anticuerpo secundario conjugado con Cy5. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las células se visualizaron en un microscopio confocal. La imagen presentada es representativa de 3 experimentos independientes.

De forma similar a la distribución de MAVS en células U937 no infectadas, RIG-I se encontró distribuida homogéneamente en el citoplasma de estas células. Sin embargo, en células U937 infectadas con DENV-2, la señal de RIG-I se agrupó en pequeños focos perinucleares, manteniendo cierta señal en el citoplasma con patrones punteados, lo cual sugiere una relocalización de RIG-I en células infectadas con DENV-2. Dicha distribución perinuclear se asemeja a la de MAVS, y parece en ambos casos concentrarse en lo que podría ser el retículo endoplásmico.

Los resultados obtenidos sugieren que RIG-I es activado durante la infección con DENV-2 en células U937 y que estos receptores activan la transducción de señales mediante la interacción con MAVS la cual induce su redistribución.

En conjunto estos resultados sugieren que RIG-I es capaz reconocer algunas de las especies de RNA producidas por DENV-2 durante la replicación y que este receptor es capaz de iniciar la respuesta antiviral que limita la replicación de DENV-2 aparentemente por un mecanismo independiente de IFN- β .

Para profundizar un poco más sobre el grado de activación de la vía de inducción de IFN- β , se decidió estudiar el paso canónico previo a la transcripción de IFN- β realizando ensayos de inmunofluorescencia para detectar la translocación nuclear del factor de

transcripción IRF-3, cuya activación es esencial para la expresión de IFN- β . Para esto, se infectaron células Huh-7 y U937 con DENV-2 por 24 h y posteriormente se realizó el marcaje indirecto de la proteína IRF-3. Para este experimento se decidió utilizar como control de inducción el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el cual se sabe es detectado por RIG-I.

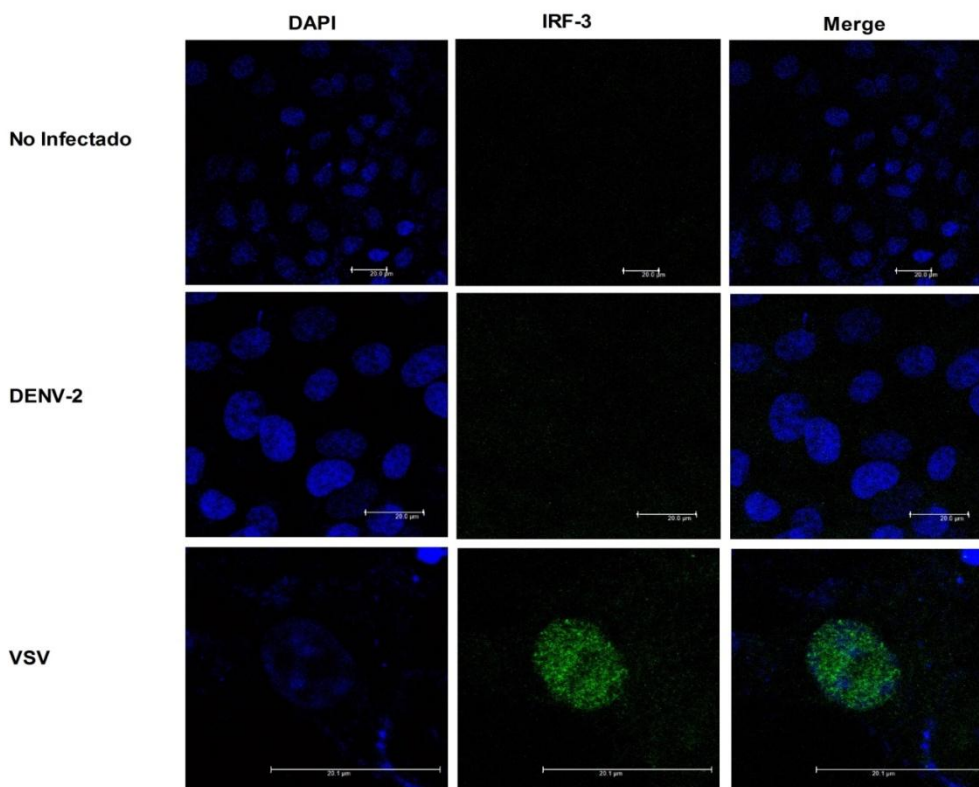


Figura 42. Inmunodetección de IRF-3 en células Huh-7 infectadas con DENV-2 y VSV. Las células Huh-7 fueron infectadas con DENV-2 o VSV durante 24 h. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído y se marco la proteína IRF-3 con un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las células se visualizaron en un microscopio confocal. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

En la figura anterior se observa una baja señal basal de la proteína IRF-3 en células Huh-7 no infectadas distribuida homogéneamente. Las células Huh-7 infectadas con DENV-2 no mostraron cambios en la intensidad de la señal de IRF-3 ni tampoco en su

localización, lo que correlaciona con la poca o nula expresión de IFN- β en estas células. Por otra parte las células Huh-7 infectadas con VSV mostraron un incremento en la intensidad de la señal de IRF-3, dicha señal colocaliza mayoritariamente con el núcleo, lo que sugiere que la proteína se encuentra en su forma activa.

Paralelamente se realizó el ensayo anterior en células U937 bajo las condiciones antes mencionadas.

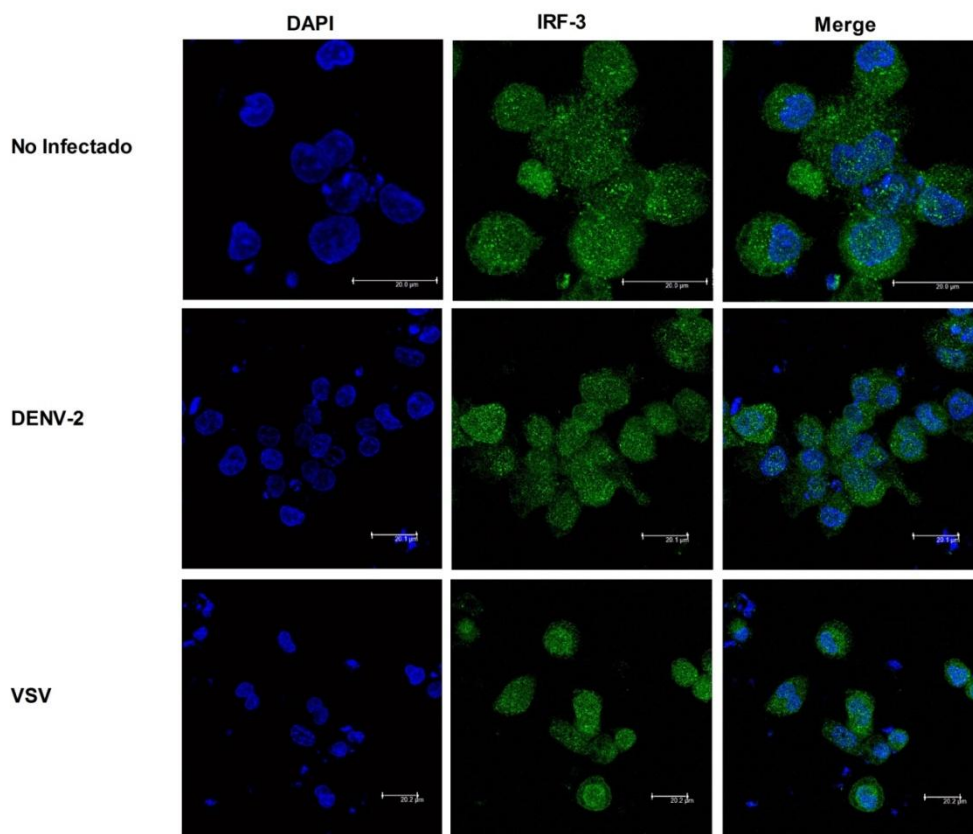


Figura 43. Inmunodetección de IRF-3 en células U937 infectadas con DENV-2 y VSV.

Las células U937 fueron infectadas con DENV-2 o VSV durante 24 h. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído y se marco la proteína IRF-3 con un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las células se visualizaron en un microscopio confocal. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

A diferencia de las células Huh-7, las células U937 mostraron una señal basal de IRF-3 observable mediante inmunofluorescencia distribuida homogéneamente. De forma similar a lo observado anteriormente en células Huh-7; la infección con DENV-2 no

produjo cambios en la intensidad de la señal o en su localización, lo que correlaciona con la disminución de la expresión de IFN- β en células U937 infectadas con DENV-2. Es importante recalcar que, las células U937 infectadas con VSV mostraron una mayor colocalización con núcleo.

Los resultados anteriores sugieren fuertemente que RIG-I es capaz de activar la transducción de señales que conducen a la inducción de IFN-I en respuesta a la infección por DENV-2, sin embargo dicho virus posee un mecanismo capaz interrumpir la señal río debajo de la activación de MAVS, inhibiendo de esta forma la activación de IRF-3, e impidiendo la transcripción de IFN- β .

Discusión y Análisis de Resultados

Recientemente ha cobrado mucho interés el estudio de los RLRs en la inducción de la respuesta inmune antiviral, así como las características moleculares presentes en los ligandos responsables de su activación. Por lo que, inicialmente el objetivo de este estudio se centró en determinar la participación de RIG-I en la expresión de citocinas durante la infección y su efecto sobre la replicación de DENV-2, así como identificar los posibles motivos presentes en las UTRs de su genoma con capacidad de inducir la expresión de IFN- β de una forma dependiente de RIG-I en células hepáticas.

Para estudiar el efecto de RIG-I sobre la replicación viral y la inducción de citocinas en respuesta a la infección se utilizó un sistema de sobreexpresión e inhibición de dicha proteína. Los resultados mostraron una mayor cantidad de RNA viral y proteína viral E en células Huh-7 en donde la función de RIG-I se encuentra inhibida, observándose una tendencia al efecto opuesto en células que sobreexpresan RIG-I silvestre, lo cual muestra un efecto directo de RIG-I sobre la replicación de DENV-2. Sin embargo, las células Huh-7 infectadas con DENV-2 no mostraron expresión de IFN- β incluso después de provocar la sobreexpresión de RIG-I. Incluso se corroboró la falta de respuesta probando RNAs transcritos *in vitro* mediante los cuales se pudo comprobar la falta de respuesta de las células Huh-7. Este hecho concuerda con un reporte, en donde se evaluó la expresión de IFN- β en diferentes líneas celulares hepáticas transfectadas con Poly I:C, y se observó que las células Huh-7 no respondieron al estímulo, a diferencia de hepatocitos primarios o la línea celular HepG2 [58]. Sin embargo, de manera controversial, en algunos estudios se ha demostrado la capacidad de ciertos RNAs del genoma de HVC de inducir IFN- β en células Huh-7 que expresan el vector reportero de IFN- β [34]. Dichas discrepancias pueden deberse a una heterogeneidad de la línea celular o al método de detección. Interesantemente, a pesar de la ausencia de IFN- β , RIG-I mostró tener un efecto negativo sobre la acumulación de RNA viral y proteína E, lo que sugiere un efecto inhibitorio de RIG-I sobre la replicación de DENV-2 independiente de IFN- β . Los reportes previos indican que RIG-I es capaz de controlar cuatro respuestas conocidas: respuesta de IRF-3/7, NF- κ B, inducción de apoptosis y formación del inflamosoma [59, 60], por lo que es

probable que alguna de estas respuestas sea la responsable de la limitación de la replicación viral en un sistema con niveles mínimos de IFN- β .

Como una alternativa para evaluar el papel de RIG-I en la inducción de IFN- β se utilizó a la línea celular de macrófagos humanos U937, ya que éstos son uno de los blancos primarios de la infección por DENV y se ha demostrado ampliamente su capacidad de expresar IFN- β . Las células U937 infectadas con DENV-2 no expresaron significativamente más IFN- β que las células no infectadas a las 24 h post-infección, incluso observándose una tendencia a la disminución en los niveles del mRNA de esta citocina. Los resultados obtenidos con las células U937 que sobreexpresan RIG-I contrastan con los obtenidos con las Huh-7, ya que estas células mostraron un modesto incremento en la expresión de IFN- β en respuesta a la infección con DENV-2. Lo anterior sugiere que bajo las condiciones probadas, **DENV-2 no induce o bloquea la inducción de IFN- β en células U937**. Un estudio reciente reveló la existencia de diversas cepas de cada serotipo de DENV capaces de evadir la respuesta de IFN- β de dos formas conocidas; un grupo de cepas es capaz de interrumpir la señalización río abajo de IFN- β mediante la inhibición de la fosforilación de STAT2, es decir que IFN-I se sobreexpresaría pero no los ISGs, lo cual se traduce en un bloqueo de la amplificación de IFN-I, mientras que otro grupo de cepas es capaz de bloquear la inducción río arriba de IRF-3, por lo cual los niveles de mRNA de IFN-I no cambiarían significativamente [61] y probablemente existan cepas con ambas actividades. Además en otro estudio se observó que en células dendríticas, DENV-2 bloquea la expresión de IFN-I a nivel de mRNA evitando la dimerización de IRF-3 por un mecanismo dependiente de la actividad catalítica del complejo de proteínas virales NS2B-3 [62]. En nuestros resultados, la cantidad de IRF-3 nuclear no cambio en células infectadas con DENV-2, pero si en células infectadas con VSV, lo que refuerza la idea de que DENV-2 inhibe la activación de IRF-3.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de inmunoprecipitación de RNA en este estudio demuestran que RIG-I es capaz de reconocer alguna de las especies de RNA generadas por DENV-2. El siguiente paso canónico de la vía de RLRs después de la detección del RNA viral es la interacción de RIG-I o MDA5 con la proteína MAVS. De tal manera que en células infectadas la proteína MAVS sufre una redistribución observable por microscopia de fluorescencia [63].

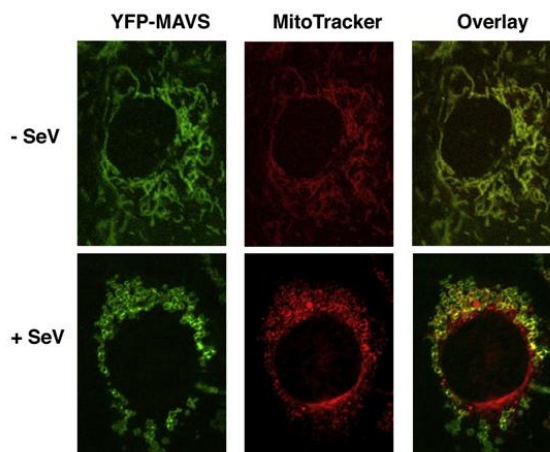


Figura 44. Redistribución de MAVS en fibroblastos de ratón infectados con el SeV. Fibroblastos de ratón KO para MAVS que expresan MAVS fusionado a la proteína amarillo fluorescente (YFP-MAVS), fueron infectados con SeV. Posteriormente se observó la proteína MAVS mediante microscopía confocal. Las mitocondrias fueron teñidas con mitotracker [63].

Por otra parte un estudio reciente reveló que la forma activa de MAVS genera grandes agregados con características de prion; es decir, forma agregados fibrosos resistentes a la digestión con proteasas y a la solubilización con detergentes, dichos agregados, tienen la capacidad de convertir la proteína MAVS nativa a la conformación “infecciosa”, y más importante aún, estos agregados tienen la capacidad de activar a IRF-3 en un sistema *in vitro* [63]. Interesantemente, la incubación del dominio CARD de RIG-I o MDA5 fue suficiente para inducir la formación de estos agregados lo cual correlaciona con el hecho de que la sobreexpresión de estos dominios induce señalización constitutiva en ausencia de infección [26]. En células no infectadas todas las mitocondrias contienen MAVS, cuando MAVS es activada por los RLRs, esta es convertida a la conformación “infecciosa” formando lo que se conoce como semillas de prion. Cada semilla de prion comienza a convertir la proteína MAVS nativa en agregados fibrosos, posteriormente mediante eventos de fisión y fusión mitocondrial la cantidad de MAVS activado es redistribuido entre las mitocondrias, dando como resultado mitocondrias sin MAVS y mitocondrias con MAVS activado adyacentes a los complejos de replicación viral [57].

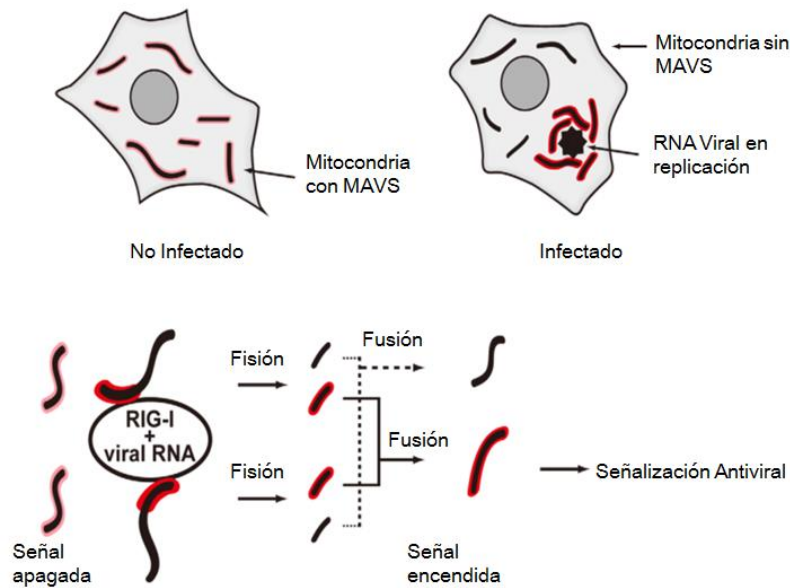


Figura 45. Modelo de la redistribución de MAVS mediado por organización mitocondrial. La redistribución de MAVS es dependiente de los procesos de fisión y fusión mitocondrial. Dando como resultado mitocondrias con poca o nula cantidad de MAVS y mitocondrias aledañas a los sitios de replicación viral con una mayor cantidad de MAVS, lo que da como resultado la activación de señalización [57].

Estos agregados fibrosos de MAVS sirven finalmente como andamiaje que permiten la interacción de otras moléculas de la vía como TRAF2 y TRAF6 para continuar la transducción de la señal hasta IRF-3.

El patrón de distribución de MAVS nos hace pensar que esta proteína se relocatea y acumula en retículo endoplásmico. Dicha teoría se ve reforzada por el hecho de que el retículo endoplásmico representa la plataforma de biogénesis de los complejos de replicación de los flavivirus [64]. Por otra parte, se ha reportado que la UTR 3' de DENV-4 interacciona con calreticulina, una chaperona multifuncional de retículo endoplásmico [65], además con el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra RNA de doble cadena se logro observar que las especies de RNA viral en el complejo de replicación de algunos flavivirus como WNV y DENV son, en su mayoría, dsRNA [64]. Consistente con nuestros resultados, la relocalización perinuclear de MAVS y RIG-I sugiere que durante la infección con DENV-2 estas proteínas se acumulan en retículo endoplásmico donde probablemente se encuentra la mayor cantidad del ligando de RIG-I. Incluso se ha reportado que la infección con DENV induce estrés de retículo endoplásmico, lo que activa la respuesta de

proteínas mal plegadas (UPR), la cual se detecta mediante la formación del splicing de XBP-1 y un incremento en la expresión de calreticulina [66, 67]. De tal manera que resultaría interesante saber si esta inducción de UPR es dependiente de MAVS.

La redistribución de MAVS observada en las células U937 infectadas con DENV-2 sugiere que la vía de RLRs está siendo activada en respuesta a la infección, sin embargo, la tendencia a la disminución de los niveles de IFN- β y la falta de activación de IRF-3 sugieren que esta vía es inhibida posteriormente. Por lo cual se podría especular que el complejo de proteínas virales NS2B/3 tiene como blancos responsables de la inhibición de la inducción de IFN- β a moléculas que se encuentran a nivel de o río arriba de IRF-3 y río abajo de MAVS.

Nuestros resultados sugieren que RIG-I es capaz de limitar la replicación de DENV-2 por un mecanismo independiente de IFN- β . A pesar de que la gran mayoría de MAVS se encuentra localizada en la membrana mitocondrial, existe una pequeña fracción de MAVS que se encuentra localizada en la membrana peroxisomal [68]. Interesantemente, MAVS peroxisomal resultó ser incapaz de inducir IFN-I, pero ésta se encontró implicada en la inducción temprana de diversos genes antivirales como Viperina, OAS1 y Mx2 en respuesta a la infección por Reovirus por un mecanismo independiente de IFN-I [68].

El papel de la señalización dependiente de MAVS durante la infección con DENV-2 fue evaluado utilizando ratones MAVS^{-/-}. Los niveles de RNA de DENV-2 fueron significativamente más altos en el suero y los tejidos linfoides de los ratones MAVS^{-/-} en tiempos tempranos comparado con ratones silvestres y además la producción de IFN-I se retrasó hasta 18 h post-infección [69, 70]. Lo que resalta la importancia de MAVS en la inducción de IFN-I en tiempos tempranos. Nuestro estudio sugiere fuertemente que MAVS se encuentra activado en la infección con DENV-2, debido a que la activación de MAVS parece ser capaz de activar parte de la respuesta antiviral es probable que el efecto de RIG-I independiente de IFN- β sobre la replicación de DENV-2 sea dependiente de MAVS.

Lo anterior se ve reforzado por el hecho de que el complejo NS2/B3 de DENV-2 es capaz de inhibir la activación de IRF-3 pero no de NF- κ B [70].

Existen numerosos reportes de proteínas virales capaces de inhibir la inducción de IFN-I. Por ejemplo, se ha observado que la proteasa NS3/4A del flavivirus HCV es capaz de degradar el dominio transmembranal de MAVS, provocando su liberación de la mitocondria, lo cual impide la activación de la respuesta antiviral [71]. Otras proteínas

virales como la PLPro del virus SARS, interfiere con la señalización de IFN-I, evitando la interacción con las proteínas IKK, lo que previene la fosforilación y dimerización de IRF-3 [72]. Además se ha reportado que la actividad de otras proteasas virales, como la NSP1 de Rotavirus o la Vpr de HIV-1, pueden provocar la proteólisis de IRF-3, previniendo de esta forma la activación de la respuesta inmune innata [73, 74].

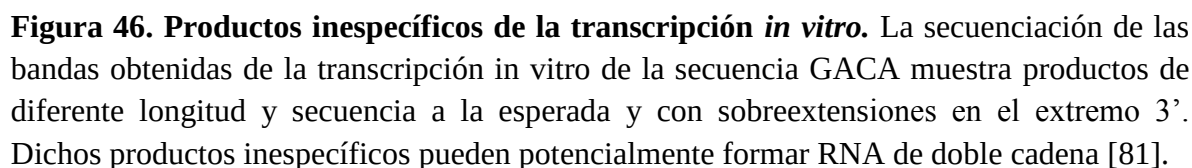
Además de estos factores virales, existen factores celulares que pudieran estar participando en la regulación negativa de la señalización de RLRs durante la infección con DENV-2, por ejemplo se ha reportado que la maquinaria de autofagia (ATG5-ATG12) puede interactuar directamente con RIG-I y MDA5 para regular negativamente su función [75, 76]. Se ha reportado un incremento en la expresión de ATG5-ATG12 en células THP1 infectadas con DENV-2 [77]. Por otra parte se ha reportado disfunción mitocondrial y bioenergética en células hepáticas y células Vero infectadas con DENV-2 [78, 79], siendo el responsable de esta disfunción un residuo de 9 aminoácidos de la proteína M conocido como ApoptoM [80]. Por todo lo anterior, se sugiere que en condiciones de infección se tendría una menor cantidad de mitocondrias funcionales las cuales son las plataformas de señalización de las RLRs.

Sin embargo en las células U937 que sobreexpresan RIG-I se producen una mayor cantidad de IFN- β en respuesta a la infección con DENV-2 a las 24 h post-infección. Este hecho probablemente se debe a que existe una mayor cantidad de sensores virales al momento en que el RNA viral llega al citoplasma, lo que incrementa considerablemente la probabilidad de ser detectado por RIG-I, lo que a su vez activaría la señalización antiviral antes de que las proteínas no estructurales cumplan su función. Lo anterior resalta la importancia de la presencia de RIG-I en el desarrollo de la enfermedad; un estudio reportó niveles incrementados de IFN- β , RIG-I y MDA5 en células THP1 infectadas con DENV-2 a tiempos tempranos, mientras que cuando se infectan estas células con un complejo de DENV-2 y anticuerpos potenciadores (ADE) simulando una infección severa, la expresión de estas moléculas no se encontró incrementada [77]. Las RLRs son genes inducibles por IFN-I, y nuestros resultados en células U937, muestran que los tres RLRs tienden a reducir su expresión en células infectadas. Lo que correlaciona con la disminución en expresión de IFN- β en dichas células.

En un intento por encontrar algún motivo contenido en las UTRs del genoma de DENV con capacidad de inducir la expresión IFN- β , nosotros delimitamos diferentes regiones de las UTRs y probamos su capacidad de inducir IFN- β en células Huh-7. Uno de los antecedentes más directos para la creación de este proyecto fue el estudio de Dina uzri et., al. en el año 2009 [34], en el cual mediante la transfección de diferentes regiones de las UTR's de HCV transcritas *in vitro* caracterizan un motivo de Poly U/UC en la UTR 3' de HCV responsable de la inducción de IFN-I, lo cual sugería fuertemente la existencia de ciertas secuencias o motivos en el RNA que activaban preferencialmente RIG-I.

Nosotros delimitamos específicamente la región DB1-DB2 de la UTR 3' ya que posee una región rica en U justo entre las estructuras DB1 y DB2 de forma similar a como se encuentra flanqueado el motivo de Poly U/UC en la UTR 3' de HCV. Sin embargo, debido a la falta de respuesta de la línea celular Huh-7 resultó imposible determinar las regiones de las UTRs de DENV-2 que inducen más IFN- β que otras o hasta que punto dejan de inducir cuando son acortadas. Es interesante el hecho de que Uzri et. al. evaluaron la capacidad de inducir IFN de las UTRs de DENV-4 en células Huh-7 y lograron detectar una minúscula activación del promotor de IFN- β comparado con la UTR 3' de HCV. Las principales diferencias entre su sistema y el nuestro, que pudieran dar origen a estas discrepancias, radican en el serotipo del virus, ya que ellos obtienen las UTRs de DENV-4 y nosotros de DENV-2 y estas difieren considerablemente, segundo; ellos detectan la inducción de IFN- β mediante ensayos de reporteros mientras que nosotros por RT-PCR en tiempo real y tercero, ellos transcriben las UTRs a partir de vector linearizado y nosotros a partir de productos de PCR con el promotor T7 purificados.

En la gran mayoría de estudios en donde se ha intentado caracterizar el ligando de RIG-I se han utilizado RNAs transcritos *in vitro* de diferente naturaleza, que van desde secuencias virales, RNAs celulares y homo/heteropolímeros. Sin embargo un estudio reciente reveló que la transcripción *in vitro* produce especies inespecíficas de RNA que pueden formar dsRNA, el cual es el responsable de la activación de RIG-I (Fig 46), ya que la misma secuencia de RNA sintetizado químicamente con 5'ppp fue incapaz de inducir IFN- β [55, 81-83].



El uso de RNA sintético ha permitido avanzar en la carrera por caracterizar el ligando de RIG-I y en definir lo que sería un PAMP viral. Recientemente se logró resolver la estructura cristalográfica del dominio CTD de RIG-I en complejo con dsRNA [55]. Dicha estructura revela aspectos interesantes sobre la interacción; se observó una relación de dos CTD por cada molécula de dsRNA en un arreglo cabeza-cola, los aminoácidos Lys861, lys858 y His847 se encontraron formando un puente de hidrógeno con el oxígeno

del fosfato β , lo que dicta la especificidad del 5'ppp. Además la Phe853 se encuentra interaccionando con el par de bases terminales de cada extremo del dsRNA, lo que explica claramente el requerimiento de extremos romos para la activación de RIG-I. Por otra parte, la Lys907 y Lys849 forma una interacción con la cadena lateral de fosfatos, lo que sugiere una baja especificidad por una secuencia consenso [55]. Sin duda alguna, la caracterización del ligando de RIG-I ha sido una tarea difícil, RIG-I tiene la facultad de unirse a una gran variedad de ligandos lo que se debe a la presencia de dos dominios de unión a RNA en la proteína, uno en el CTD, responsable de la unión a 5'ppp y otro en el dominio de helicasa implicado en la unión a dsRNA como Poly I:C [29]. En un estudio de espectrometría de masas se identificaron un grupo de péptidos de RIG-I que pueden formar entrecruzamiento con su ligando; se encontraron 6 péptidos que mapean en el CTD y 24 péptidos en el dominio de helicasa capaces de interaccionar con el ligando [40]. Todo lo anterior en conjunto sugiere fuertemente que la especificidad de RIG-I está determinada por las características del primer par de bases del dsRNA y su interacción con el CTD más que por el dominio de helicasa que puede unirse al dsRNA en diferentes puntos sin una secuencia específica. En la actualidad lo que se considera el mejor ligando de RIG-I es 5'ppp dsRNA corto con extremos romos [83] (Fig. 44).

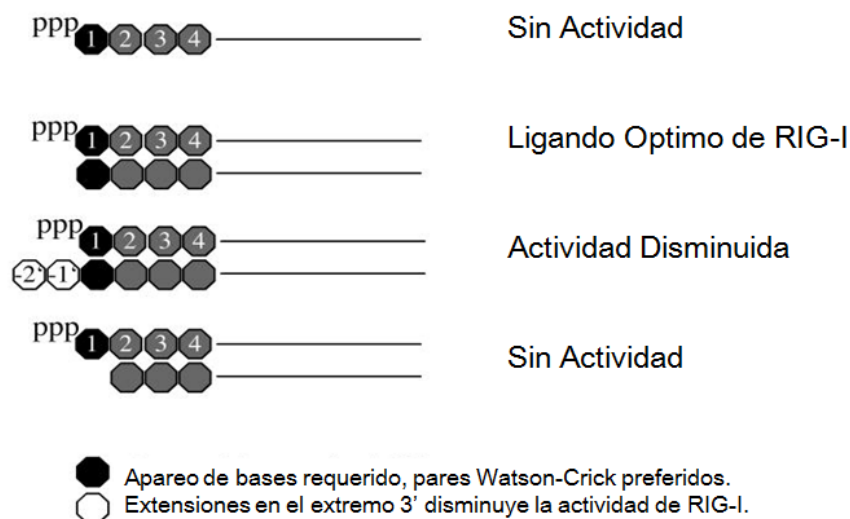


Figura 47. Estructura molecular del ligando de RIG-I. La activación óptima de RIG-I requiere dsRNA con extremo romo y al menos un grupo trifosfato. Los nucleótidos despareados en el extremo no trifosforilado afectan ligeramente la actividad de RIG-I mientras que los nucleótidos despareados en el extremo trifosforilado no son tolerados [83].

Además se ha demostrado la importancia del primer nucleótido en la activación de RIG-I, a pesar de que pppA, pppG y pppC difirieron ligeramente ($A > G > U$), pppC indujo 50% menos IFN-I. Es interesante el hecho de que la mayoría de los genomas virales empiezan con A (excepciones HCV: ppG; Ebola: pppU) mientras que no se conoce ninguno que empiece con pppC [83].

En el caso del genoma de DENV, este parece no poseer ninguna de las características del ligando óptimo de RIG-I. Primeramente el grupo 5'ppp se encuentra unido a una estructura 7mG Cap, lo que sugiere que la cadena de polaridad positiva no es reconocida por RIG-I. Segundo, las interacciones entre la UTR 5' y 3' mediadas por las secuencias CS y UAR circularizan el genoma viral en la cual el primer nucleótido no forma dsRNA de extremo romo, de hecho la secuencia 5' SLA forma un overhang de 2 nucleótidos en el extremo trifosforilado lo cual no es tolerado por RIG-I. Sin embargo en la forma circularizada del genoma de DENV existe un tracto de dsRNA formado por la secuencia UAR que se parece más a lo que se especula ser el ligando de MDA5 (RNA en forma de Red). Sin embargo en algún momento, durante la replicación viral la cadena de polaridad negativa se encuentra sin estructura cap y en forma de dsRNA con extremo romo lo que podría ser el momento en que puede ser reconocido por RIG-I. Aunque el primer nucleótido sería pppC, el cual es un débil activador de RIG-I [83]. Interesantemente, el genoma de ciertos aislados de DENV-3 (HQ166034) no empieza con pppA si no con pppU, por lo que sería interesante estudiar el efecto de esta substitución en la inducción de IFN-I, replicación y traducción viral, y desarrollo de la enfermedad, ya que dicho nucleótido en esa posición parece estar ampliamente conservado, es probable que esta sea importante para la replicación o traducción y que por lo tanto, el virus no pueda cambiarlo para evadir la detección sin sacrificar su propia replicación.

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha sugerido que el gen de RIG-I evolucionó para tener una afinidad preferencial por pppA en el primer nucleótido. El virus del dengue al no poder evitar tener ese PAMP en su genoma utiliza diferentes estrategias para evadir el sistema del IFN-I en todos los niveles desde tiempos tempranos de la infección, que van desde evitar la detección ocultando el 5'ppp con estructura cap; inhibir la inducción de IFN-I río arriba de IRF-3 e inhibir la señalización río abajo del receptor de IFN- β .

Es probable que no existan secuencias específicas necesarias para la activación de RIG-I en las UTR's de DENV, sin embargo debido a los problemas que presenta el uso de

RNAs transcritos *in vitro* para estudiar la inducción de IFN-I, nos resulta imposible determinar que regiones de las UTR's de DENV tienen más capacidad de activar el promotor de IFN- β , pero el hecho de que la transfección de la UTR 5' y 3' de DENV hibridadas en solución mostró tener la mayor capacidad de activar el promotor de IFN- β en células U937, lo que confirma la capacidad del dsRNA de inducir dicha citocina. En la actualidad se aborda este problema de dos formas principales: lo más recomendable es sintetizar químicamente oligonucleótidos de RNA a los cuales se les adiciona el grupo 5'ppp por métodos químicos y de ser necesario se hibrida con su cadena complementaria sintetizada de la misma forma, este método garantiza RNA libre de productos inespecíficos, sin embargo esta tecnología se encuentra limitada a la síntesis de oligonucleótidos de RNA de 50 nt. Otra solución que se ha encontrado es la purificación del RNA por métodos cromatográficos o separar los productos de la transcripción *in vitro* en un gel de polyacrilamida y purificar la banda de interés, aunque este método no resuelve el problema de la sobre-extensión producida por la polimerasa T7 [84].

Ahora se sabe que el RNA de cadena sencilla no activa RIG-I, sin embargo se ha observado que la digestión con RNasa L de diferentes regiones del genoma de HCV produce al parecer productos de cadena sencilla que se pliegan formando doble cadena que inducen IFN- β a través de RIG-I [85]. Interesantemente en este mismo estudio se identificaron diferentes regiones del genoma de HCV inmunoprecipitables por RIG-I de la cual la región NS5 mostró tener la mayor cantidad de clones que fueron inmunoprecipitados por RIG-I, se ha observado que esta región en HCV es altamente estructurada [85]. Como una alternativa para abordar el problema que presenta el uso de RNA transcrito *in vitro*, se decidió demostrar la interacción directa *in vivo* de RIG-I con el genoma de DENV-2 en las células infectadas y se procedió a la inmunoprecipitación de la proteína RIG-I recombinante y posteriormente a amplificar un fragmento de 230 pb correspondiente a la región NS5 en el RNA inmunoprecipitado por RIG-I. De lo cual surgen algunas preguntas sobre la naturaleza de este RNA, ¿Se esta inmunoprecipitando el genoma completo o solo un fragmento?, ¿De qué longitud es este fragmento?, ¿Qué otros fragmentos son reconocidos por RIG-I?, ¿dsRNA complementario o ssRNA autoplegado y de que polaridad? ó ¿Cuál es la longitud mínima y qué nucleótidos interactúan directamente con el CTD de RIG-I? Por lo que un estudio más profundo sería necesario para contestar

estas y otras preguntas acerca de la naturaleza de las especies de RNA de DENV inmunoprecipitadas *in vivo* por RIG-I.

Conclusiones

- La inhibición de la actividad de RIG-I incrementa los niveles de RNA y proteína viral, en células Huh-7 y U937.
- El efecto negativo que tiene RIG-I sobre la replicación de DENV-2, es independiente de IFN- β , en células Huh-7.
- DENV-2 es capaz regular negativamente la inducción de IFN-I en células U937.
- La sobreexpresión de RIG-I incrementa la respuesta de IFN-I en células U937.
- RIG-I es capaz de inmunoprecipitar al menos un fragmento del genoma de DENV-2 que contiene la región NS5.
- La infección con DENV-2 induce la redistribución de MAVS en células U937.
- RIG-I sufre una relocalización en células U937 infectadas con DENV-2.
- DENV-2 inhibe la activación de IRF-3.

Literatura citada

1. Pinheiro, F.P. and S.J. Corber, *Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas*. World Health Stat Q, 1997. **50**(3-4): p. 161-9.
2. Messer, W.B., et al., *Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(7): p. 800-9.
3. Malavige, G.N., et al., *Dengue viral infections*. Postgrad Med J, 2004. **80**(948): p. 588-601.
4. Chambers, T.J., et al., *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 649-88.
5. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Molecular biology of flaviviruses*. Adv Virus Res, 2003. **59**: p. 23-61.
6. Lodeiro, M.F., C.V. Filomatori, and A.V. Gamarnik, *Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication*. J Virol, 2009. **83**(2): p. 993-1008.
7. Chiu, W.W., R.M. Kinney, and T.W. Dreher, *Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8303-15.
8. Alvarez, D.E., et al., *Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication*. Virology, 2005. **339**(2): p. 200-12.
9. Alvarez, D.E., et al., *Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6631-43.
10. Tassaneetrithep, B., et al., *DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 823-9.
11. Chen, Y., et al., *Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 866-71.
12. Reyes-del Valle, J. and R.M. del Angel, *Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand*. J Virol Methods, 2004. **116**(1): p. 95-102.
13. Navarro-Sanchez, E., P. Despres, and L. Cedillo-Barron, *Innate immune responses to dengue virus*. Arch Med Res, 2005. **36**(5): p. 425-35.
14. Allison, S.L., et al., *Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 695-700.
15. Avirutnan, P., et al., *Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6338-46.
16. Williams, B.R., *Type I interferons (IFN) are essential mediators of innate and specific immunity against viruses*. Viral Immunol, 2002. **15**(1): p. 1-2.
17. Randall, R.E. and S. Goodbourn, *Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 1): p. 1-47.
18. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 559-68.

19. Khabar, K.S., et al., *Interleukin-8 selectively enhances cytopathic effect (CPE) induced by positive-strand RNA viruses in the human WISH cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(3): p. 774-8.
20. Medin, C.L., K.A. Fitzgerald, and A.L. Rothman, *Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11053-61.
21. Loo, Y.M., et al., *Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 335-45.
22. Saito, T., et al., *Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 582-7.
23. Kawai, T. and S. Akira, *Antiviral signaling through pattern recognition receptors*. J Biochem, 2007. **141**(2): p. 137-45.
24. Thompson, A.J. and S.A. Locarnini, *Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 435-45.
25. Yoneyama, M. and T. Fujita, *[RIG-I: critical regulator for virus-induced innate immunity]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2004. **49**(16): p. 2571-8.
26. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
27. Yu, M., et al., *Cloning of a gene (RIG-G) associated with retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells and representing a new member of a family of interferon-stimulated genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7406-11.
28. Huang, F., et al., *Identification and temporal expression pattern of genes modulated during irreversible growth arrest and terminal differentiation in human melanoma cells*. Oncogene, 1999. **18**(23): p. 3546-52.
29. Yoneyama, M., K. Onomoto, and T. Fujita, *Cytoplasmic recognition of RNA*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(7): p. 841-6.
30. Barral, P.M., et al., *Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity*. Pharmacol Ther, 2009. **124**(2): p. 219-34.
31. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
32. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
33. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
34. Uzri, D. and L. Gehrke, *Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4174-84.
35. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
36. McCartney, S.A., et al., *MDA-5 recognition of a murine norovirus*. PLoS Pathog, 2008. **4**(7): p. e1000108.
37. Pichlmair, A., et al., *Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10761-9.

38. Cui, S., et al., *The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I*. Mol Cell, 2008. **29**(2): p. 169-79.
39. Narita, R. and T. Fujita, *[Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2008. **53**(14): p. 1832-40.
40. Takahashi, K., et al., *Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses*. Mol Cell, 2008. **29**(4): p. 428-40.
41. Sumpter, R., Jr., et al., *Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2689-99.
42. Fredericksen, B.L., et al., *Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 609-16.
43. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 981-8.
44. Saha, S.K., et al., *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3257-63.
45. Kayagaki, N., et al., *DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production*. Science, 2007. **318**(5856): p. 1628-32.
46. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 491-6.
47. Honda, K., et al., *IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses*. Nature, 2005. **434**(7034): p. 772-7.
48. Takahashi, K., et al., *Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4520-4.
49. Takeuchi, O. and S. Akira, *MDA5/RIG-I and virus recognition*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(1): p. 17-22.
50. You, S. and C.M. Rice, *3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U)*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 184-95.
51. Saito, T., et al., *Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 523-7.
52. Chang, T.H., C.L. Liao, and Y.L. Lin, *Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation*. Microbes Infect, 2006. **8**(1): p. 157-71.
53. Polacek, C., J.E. Foley, and E. Harris, *Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region*. J Virol, 2009. **83**(2): p. 1161-6.
54. Conceicao, T.M., et al., *Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response*. J Infect, 2010. **60**(1): p. 65-75.
55. Wang, Y., et al., *Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(7): p. 781-7.
56. Marq, J.B., et al., *Short double-stranded RNAs with an overhanging 5' ppp-nucleotide, as found in arenavirus genomes, act as RIG-I decoys*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6108-16.
57. Onoguchi, K., et al., *Virus-infection or 5'-ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001012.

58. Preiss, S., et al., *Characterization of the innate immune signalling pathways in hepatocyte cell lines*. J Viral Hepat, 2008. **15**(12): p. 888-900.
59. Poeck, H., et al., *Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 63-9.
60. Besch, R., et al., *Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2399-411.
61. Umareddy, I., et al., *Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 12): p. 3052-62.
62. Rodriguez-Madoz, J.R., et al., *Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9760-74.
63. Hou, F., et al., *MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response*. Cell, 2011. **146**(3): p. 448-61.
64. Gillespie, L.K., et al., *The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex*. J Virol, 2010. **84**(20): p. 10438-47.
65. Yocupicio-Monroy, R.M., et al., *Cellular proteins from human monocytes bind to dengue 4 virus minus-strand 3' untranslated region RNA*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3067-76.
66. Paradkar, P.N., et al., *Unfolded protein response (UPR) gene expression during antibody-dependent enhanced infection of cultured monocytes correlates with dengue disease severity*. Biosci Rep, 2011. **31**(3): p. 221-30.
67. Nasirudeen, A.M., et al., *RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(1): p. e926.
68. Dixit, E., et al., *Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity*. Cell, 2010. **141**(4): p. 668-81.
69. Perry, S.T., et al., *Cardif-mediated signaling controls the initial innate response to dengue virus in vivo*. J Virol, 2009. **83**(16): p. 8276-81.
70. Rodriguez-Madoz, J.R., et al., *Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4845-50.
71. Li, X.D., et al., *Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(49): p. 17717-22.
72. Devaraj, S.G., et al., *Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus*. J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32208-21.
73. Barro, M. and J.T. Patton, *Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4473-81.
74. Okumura, A., et al., *HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation*. Virology, 2008. **373**(1): p. 85-97.
75. Lee, Y.R., et al., *Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication*. Virology, 2008. **374**(2): p. 240-8.

76. Tal, M.C. and A. Iwasaki, *Autophagic control of RLR signaling*. Autophagy, 2009. **5**(5): p. 749-50.
77. Ubol, S., et al., *Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies*. J Infect Dis, 2010. **201**(6): p. 923-35.
78. Zargar, S., T.A. Wani, and S.K. Jain, *Morphological changes in vero cells postinfection with dengue virus type-2*. Microsc Res Tech, 2010.
79. El-Bacha, T., et al., *Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(10): p. 1158-66.
80. Catteau, A., et al., *Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation*. Biochimie, 2003. **85**(8): p. 789-93.
81. Schmidt, A., et al., *5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 12067-72.
82. Schlee, M. and G. Hartmann, *The chase for the RIG-I ligand--recent advances*. Mol Ther, 2010. **18**(7): p. 1254-62.
83. Schlee, M., et al., *Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 25-34.
84. Triana-Alonso, F.J., et al., *Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during in vitro transcription with T7 RNA polymerase*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 6298-307.
85. Malathi, K., et al., *RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP*. RNA, 2010. **16**(11): p. 2108-19.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 30 de Julio del 2012, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Ing. Roberto Ramírez Mendoza.

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio
Monroy

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Dra. Rosa María del Ángel Núñez

Dr. Mauricio Castañón Arreola
