



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

“Sub-expresión de genes de la respuesta inmune en células infectadas con Parvovirus”

T E S I S

(idónea Comunicación de Resultados)

**QUÉ PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA:**

Biol. Tania Reyes Cruz

COMITÉ TUTORAL

**Director Tesis: Dr. Daniel Martínez Gómez
Codirector Tesis: M. en C. Estela T. Méndez Olvera
Asesor: Dra. Monika Palacios Martínez**

Ciudad de México. Mayo 2017

El jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, aprobó la tesis titulada:

“SUBEXPRESIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE EN CÉLULAS INFECTADAS CON PARVOVIRUS”. Que presentó:

Biol. Tania Reyes Cruz

El día 12 de mayo de 2017

JURADO DE EXAMEN

Dra. Edith Cortés Barberena

PRESIDENTA

M. en C. Inda Marcela Figueroa Ochoa

SECRETARIA

M. en C. Estela T. Méndez Olvera

VOCAL

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial especialmente a Daniel Martínez Gómez y Estela Méndez Olvera les agradezco su apoyo incondicional, su guía, paciencia, esmero y amistad.

A los sinodales: Dra. Edith Cortés Barberena, M. en C. Inda Marcela Figueroa Ochoa y M. en C. Estela T. Méndez Olvera por sus comentarios que enriquecieron el presente trabajo

A mis compañeros de los laboratorios de Biología Molecular y Microbiología Agropecuaria: Liz, Itzel, Jonathan, Mau, Alejandra, Pily, Mariana, Angie, Dafne, Pamela, Lobo, Martha y Mirna. Gracias por su apoyo, solidaridad y comprensión en momentos difíciles y sobre todo por todas las risas compartidas.

A mi familia, refugio del alma, su compañía siempre da energía a mi vida.

A mi abue principio de lo que conozco, cimiento familiar que permite alcanzar metas de vida. Gracias por el gran esfuerzo que ha representado para ti construir una familia.

A ti mi corazón que nunca has soltado mi mano y has caminado la vida conmigo desde hace tiempo ya, tu ayuda diaria ha sido indispensable en todos los aspectos de la vida.

A mi hermana Bere, pedacito tangible que mamá me regalo, simplemente te amo hermana.

A mamá quien me abrió el corazón al conocimiento, siendo siempre mi guía y a quien debo todo lo que soy; éste y todos mis logros van por ti hasta donde estés.

*“The mind that opens to a new idea
never returns to its original size”*

Einteín

a mí madre

al amor

ÍNDICE

	Pag
Resumen	1
Capítulo I	
Introducción	2
1.1. Familia Parvoviridae.....	4
1.1.1. Género <i>Protoparvovirus</i>	4
1.2. Parvovirus canino	5
1.2.1 Estructura	5
1.2.2. Patología y Epidemiología	6
1.2.3. Ciclo viral	8
1.2.3.1. Reconocimiento y Entrada.....	8
1.2.3.2. Tráfico intracelular	9
1.2.3.3. Replicación	10
1.2.3.4. Salida	11
1.3. Interacción Parvovirus-célula hospedera	17
1.4. Mecanismos inmunes de control viral	15
1.4.1. Centros de Organización Supramoleculares	15
1.4.2. Myddosoma y receptores tipo Toll	17
1.4.3. Inflamasoma y receptores tipo NOD	18
1.4.4. Receptores tipo RIG.....	18
1.5. Mitocondria e inmunidad innata	21
1.5.1. Mitocondria y virus	22
1.5.2. Vía activación MAVS	22
1.5.3. MAVS y regulación actividad antiviral	26
1.5.4. Mitocondria y apoptosis	30

1.6.	Interferón	33
1.6.1.	ISGs y patogénesis viral	35
1.6.2.	Activación y Expresión de ISGs	36
1.7.	Proteínas antivirales IFIT	38
1.7.1.	Familia	39
1.7.2.	Estructura	39
1.7.3.	Expresión	40
1.7.4.	Actividad antiviral y mecanismos de acción	42
1.7.4.1.	Inhibición traducción celular	43
1.7.4.2.	Unión a 2'-O	44
1.7.4.3.	Unión a RNA 5'PPP	44
1.7.4.4.	Unión a proteínas virales	45
1.7.5.	Modulación respuesta inmune innata	45

Capítulo II

2.1.	Hipótesis.....	48
2.2.	Objetivos	48
2.2.1.	General	
2.2.2.	Particulares	

Capítulo III

Material y Métodos

3.1.	Lugar de Trabajo	49
3.2.	Cepa <i>wt</i> Parvovirus canino.....	49
3.3.	Plásmido PVCMAN.....	49
3.3.1.	Cultivo	49
3.3.2.	Extracción ADN	49
3.3.3.	PCR proteína VP2	50
3.3.4.	Copias genómicas VP2 por q-PCR	50
3.4.	Células MDCK	51
3.4.1.	Cultivo	51
3.4.2.	Cuantificación células MCDK	52

3.5.	Cultivo Parvovirus canino <i>in vitro</i>	53
3.6.	Curva de replicación PVC.....	53
3.6.1.	Ensayo de infección (placa 6 pozos)	53
3.6.2.	Ensayo de infección (placa 48 pozos)	53
3.6.2.1.	Células MDCK sin infectar	54
3.6.2.2.	Células tratadas con IFN	55
3.6.2.3.	Células tratadas con IFN y PVC	55
3.6.2.4.	Células infectadas con PVC	55
3.6.3.	Extracción ADN	56
3.6.4.	Diseño iniciadores PCR y q-PCR	57
3.6.5.	PCR y q-PCR copias genómicas NS1	57
3.7.	Fase Temprana y Tardía de infección	58
3.7.1.	Ensayo de infección <i>in vitro</i>	58
3.7.1.1.	Células MDCK sin infectar	58
3.7.1.2.	Células tratadas con IFN	58
3.7.1.3.	Células tratadas con IFN y PVC	59
3.7.1.4.	Células infectadas con PVC	59
3.7.2.	Extracción RNA	59
3.7.3.	Diseño iniciadores PCR y RT-qPCR	60
3.7.4.	Síntesis cDNA por RT-qPCR	60
3.7.5.	Cuantificación transcritos RNAm	61
3.9.	Análisis Estadístico	62

Capítulo IV

Resultados

4.1.	Cultivo y amplificado VP2 plásmido PVCMAN	63
4.2.	Cultivo células MDCK e infección por PVC	63
4.3.	Cultivo PVC <i>in vitro</i>	64
4.3.1.	Extracción ADN y amplificado VP2 y NS1	64
4.4.	Curva patrón NS1 por q-PCR	66
4.5.	Curva replicación viral	67

4.6.	Curva replicación viral células tratadas IFN	68
4.7.	Fase Temprana y Tardía de infección	69
4.7.1.	Cuantificación transcritos RNAm	71
4.7.1.1.	Transcritos proteínas VP2 y NS1	71
4.7.1.2.	Transcritos IFN β	73
4.7.1.3.	Transcritos IFIT1 e IFIT3	74
Capítulo V		
	Discusión	76
Capítulo VI		
	Conclusiones	82
Capítulo VII		
	Bibliografía	83
7.1.	Paginas web	98
ANEXOS		
1	Extracción ADN-Lisis alcalina	100
2	Purificación productos PCR	101
3	Extracción ADN-silica/tiocianato guanidina	102
4	Extracción RNA-TRIZOL	103
GLOSARIO		104
ARTICULO		106
CONSTANCIA CONGRESO		116

RESUMEN

El parvovirus canino (PVC) es un virus pequeño, no envuelto. Su genoma es una sola cadena de ADN de 5kb, en la que sólo se codifican tres proteínas. A pesar de su pequeño genoma, el PVC ha desarrollado estrategias de evasión de la respuesta inmune innata del hospedero, lo que facilita su supervivencia y proliferación dentro de las células. En las células infectadas con PVC, la producción de IFN β desempeña un papel importante en la inmunidad innata, modulando la expresión de las proteínas antivirales IFIT (*interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*). En la infección por PVC, se ha descrito una asociación del virión con la mitocondria que podría interferir con los mecanismos de señalización en la célula. Con el fin de comprender los mecanismos de interferencia inmunológica que permiten una replicación exitosa del virus, en el presente trabajo se evaluó la expresión de genes de la respuesta inmune innata (IFN β , IFIT1 e IFIT3) en células infectadas con PVC. Para evaluar los mecanismos virales de interferencia, células MDCK fueron infectadas con una cepa de PVC wt. El número de copias virales se cuantificó mediante q-PCR y se establecieron dos fases durante la infección, temprana (día 8) y tardía (día 11). En estas fases se evaluó la expresión de IFN β , IFIT1 e IFIT3. Los resultados obtenidos muestran una diferencia en la expresión de IFN β , IFIT1 e IFIT3 durante las fases temprana y tardía ($p < 0,001$). En la fase tardía, las proteínas IFIT1 e IFIT3 aumentaron su expresión mostrando una respuesta inmune innata en el hospedero a la infección por Parvovirus canino. Durante la fase temprana la baja expresión de estas proteínas se relacionó con la reducción de la expresión de IFN β . Esto fue corroborado por el aumento gradual de esta interleucina durante la fase tardía. Así mismo, mediante cuantificación por RT-qPCR, se estableció que la primer proteína expresada durante la fase temprana es NS1 (inicio de la replicación de PVC); así mismo la sobreexpresión de VP2 durante la fase tardía muestra el comienzo del ensamblaje de viriones de PVC.

Palabras clave: Parvovirus canino, MAVS, IFN β , IFIT 1 e IFIT3



Capítulo I

INTRODUCCIÓN

Los virus son agentes infecciosos que dependen para su supervivencia y replicación de células hospederas. Debido a la alta presión evolutiva que los virus ejercen sobre sus hospederos, estos han desarrollado mecanismos para limitar su replicación. De igual forma, los virus han coevolucionado con estos mecanismos y han desarrollado estrategias para evadir el sistema inmunitario celular (Alcami y Ulrich, 2000).

La característica fundamental de los virus es su absoluta dependencia de un hospedero para establecerse, por lo que son considerados parásitos obligados (Fritz *et al.*, 2006). Ha sido durante la última década, que se ha buscado responder qué es lo que los virus hacen para invadir células y replicarse en ellas, describiéndose con ello principios inmunológicos básicos. De igual forma, la búsqueda de respuestas a esta interrogante ha permitido describir procesos únicos que les permiten escapar y/o modular la respuesta inmune del hospedero logrando una infección exitosa. (Alcami y Ulrich, 2000). El objetivo principal de los virus es lograr una replicación y su establecimiento en nuevos hospederos. El desarrollo de proteínas de reconocimiento de patrones, por parte del hospedero hace a los virus vulnerables a los mecanismos de control inmune erradicando la infección. (Alcami y Ulrich, 2000).

Saber qué ocurre durante la asociación del virus con una célula hospedera permite entender cómo se desencadena y se controla una infección (patogénesis viral). Conocer los principios básicos de la relación hospedero-virus y la modulación de la respuesta inmune durante este proceso nos permitirá entender cómo la naturaleza de la infección viral depende del efecto de la replicación viral sobre las células hospederas, la respuesta del sistema de defensa del hospedero y la habilidad del virus para diseminarse (Flint *et al.*, 2004).

La descripción de las capacidades inmunoregulatoras de los virus hasta la fecha es un tema emergente y aún quedan muchas preguntas sin resolver incluyendo, ¿qué eventos son necesarios durante una infección aguda?; ¿qué eventos son indispensables para el



mantenimiento de la replicación viral?; y ¿qué eventos aseguran la transmisión de virus a un nuevo hospedero? La información con que se cuenta para resolver estas preguntas es limitada, en ocasiones por la dificultad del cultivo *in vitro* del virus en cuestión o por falta de modelos animales.

Un eslabón importante en el desarrollo de la respuesta inmune del hospedero involucra a la mitocondria; es decir, la mitocondria no solo está implicada directamente en una gran variedad de procesos metabólicos (producción de ATP, homeostasis de calcio, proliferación celular, muerte celular programada y la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y lípidos), sino que participa también en la regulación de mecanismos de inmunidad contra factores extrínsecos como los virus. Así la mitocondria juega un rol central en la defensa primaria del hospedero ante infecciones virales. Para entender los mecanismos moleculares implicados durante la replicación viral, es importante estudiar a detalle los procesos que involucran a la mitocondria durante la respuesta inmune ante una infección viral (Nykyk *et al.*, 2014).

La identificación y análisis de estrategias de evasión y modulación de la respuesta inmune por parte de los virus en un hospedero nos permitirá un mejor entendimiento de la patogénesis viral. Al establecer las interacciones positivas o negativas entre células y virus seremos capaces de desarrollar vacunas seguras, y mejores y más eficaces estrategias de tratamiento y control de patologías virales.

En este trabajo se estudió la relación entre la producción de las proteínas antivirales IFIT1, IFIT 3 e IFN β y la expresión de proteínas de Parvovirus Canino durante la infección en cultivo celular, como modelo biológico de activación y regulación de la respuesta inmune del hospedero ante las infecciones virales.



1.1. FAMILIA Parvoviridae

Los miembros de esta familia son virus pequeños, no envueltos con simetría icosaédrica. Su genoma de alrededor de 5.2kb, es una cadena sencilla lineal de ADN. La familia Parvoviridae está dividida en 2 subfamilias, según los hospederos que infecta: Parvovirinae (vertebrados) y Densovirinae (insectos y artrópodos) (Tattersall *et al.*, 2005). Los miembros de la subfamilia Parvovirinae están agrupados en 8 géneros según su filogenia y sus proteínas: *Protoparvovirus*, *Amdovirus*, *Avevirus*, *Bocavirus*, *Copivirus*, *Dependovirus*, *Eritrovirus* y *Tetraparvovirus*.

1.1.1. GÉNERO *Protoparvovirus*

Actualmente se reconocen solo cinco especies en este género. Las especies están definidas como grupos de virus similares que codifican una proteína de replicación particular, típicamente llamada NS1, la cual es al menos 85% idéntica a la proteína codificada por otros miembros de la especie. Las especies reconocidas en el género *Protoparvovirus* incluyen: 1) Protoparvovirus de Carnívoros (parvovirus canino CPV y parvovirus felino); 2) Primate protoparvovirus (bufavirus humanos); 3) Protoparvovirus de ratón 1, MPV1 (parvovirus H-1 KRV, virus Kilham de rata, virus LuIII, virus minute del ratón MVM, parvovirus de ratón); 4) El protoparvovirus de roedor 2 (parvovirus de rata 1) y 5) Ungulate parvovirus (parvovirus porcino PPV) (ICTV, 2016). Tienen replicación intracelular utilizando a la célula en fase S, ya que requieren una mitosis celular activa para infectar y duplicar su ADN. El conocimiento de la biología y potencial patogénico de la familia Parvoviridae ha sido descrito por estudios realizados en miembros del género *Protoparvovirus*, gracias a que crecen fácilmente *in vitro* y se logra infección en especies susceptibles de manipulación experimental.



1.2. *Parvovirus canino*

Parvovirus Canino (CPV) es un patógeno pandémico en perros desde 1970, es miembro de la familia Parvoviridae, género *ProtoParvovirus*. Son virus pequeños icosaédricos (25-30 nm), no envueltos. Su genoma consta de alrededor de 5.2 kb con palíndromos terminales, es lineal y contiene dos ORFs (marcos abiertos de lectura).

1.2.1. ESTRUCTURA

Los ORFs codifican para 2 proteínas no estructurales NS1 y NS2; tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3); VP1 y VP2 son productos de un mismo gen (Cotmore y Tattersall, 1987) y VP3 resulta de la proteólisis y remoción de un aminoácido terminal de VP2 (Meunier *et al.*, 1985). Las proteínas no estructurales del PVC muestran alta homología en sus secuencias y son consideradas las responsables de la citotoxicidad y patogenicidad inducida por el PVC en células permisivas (Iseki *et al.*, 2005) (Figura 1, tabla 1).

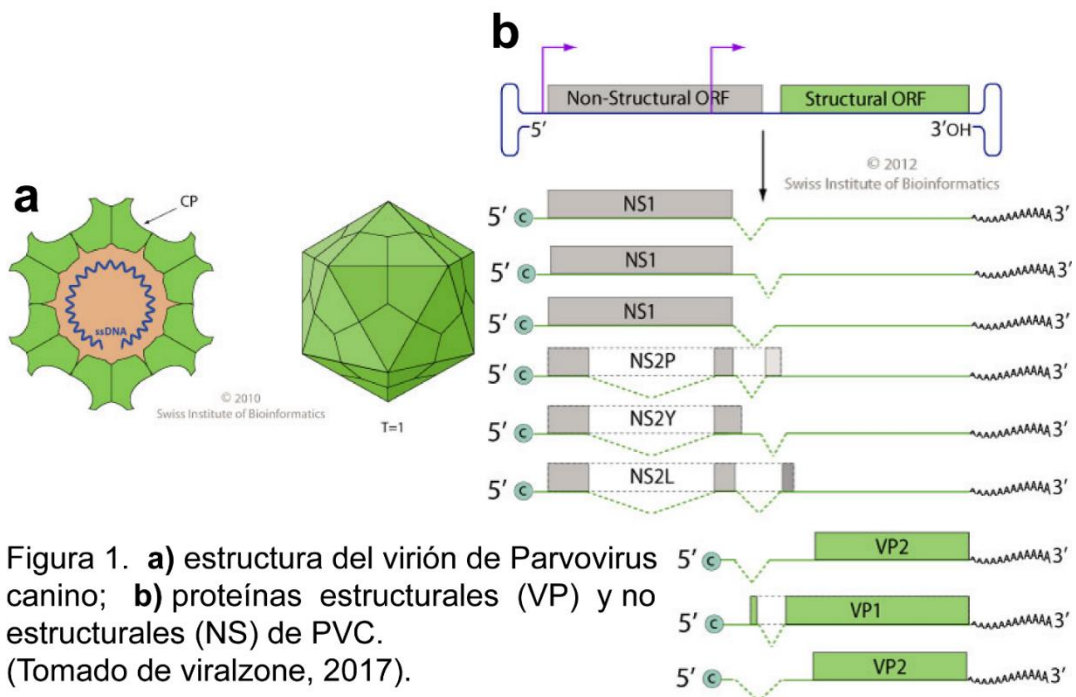


Tabla 1. Funciones conocidas de las proteínas de PVC

Proteína	Función	Referencia
NS1	Proteína primaria responsable de citopatología de PVC. Arresta ciclo celular en fase G1 PV19. Alteraciones estructurales del citoesqueleto.	(Morita <i>et al.</i> , 2003; Poole <i>et al.</i> , 2006)
	Induce apoptosis en células MCDK. Posible inducción sobre p53 y Bcl-2 en células HeLa por activación de caspasa 3	(Lovlee <i>et al.</i> , 2013)
	Central en la replicación y expresión del genoma viral. Se autorregula y modula otras proteínas. Fosfoproteína pleiotrópica nuclear. Esencial en replicación de PVC. Dominios con función de ATPasa/helicasa y activación de la transcripción.	(Gilbert <i>et al.</i> , 2005)
	Proteína multifuncional Actividad citotóxica Papel principal en replicación viral PVC Regulador del promotor viral Induce muerte celular Causa acumulación de ROS	(Gupta <i>et al.</i> , 2016)
	Requerida para formación de cápsides. Cambios en secuencia confiere habilidad a PVC para completar su replicación. Responsable de ensamblado y exportación nuclear de la cápside. Se acumula 3 veces más rápido que NS1 durante la fase S.	(Gilbert <i>et al.</i> , 2005)
VP1	Conforma el 10% de la estructura icosaédrica de la cápside. Da soporte a la porción N-terminal, clave en el ensamblaje.	(Parrish, 1994)
VP2	Responsable de las interacciones virus-receptor celular. Forma 90% de la cápside. Contiene los aa responsables de la unión virus-célula, sitios hospedero-específicos: Asp 93 y Asp 323. No se aglutina virus con cambio en Asp 377.	(Appel <i>et al.</i> , 1979; Carmichael <i>et al.</i> , 1980; Muzyczka y Berns, 2001)
VP3	No está codificada propiamente por el genoma viral, Se forma cuando se encapsula el ADN viral, por unión a la proteína VP2 ya formada.	(Parrish, 1994)

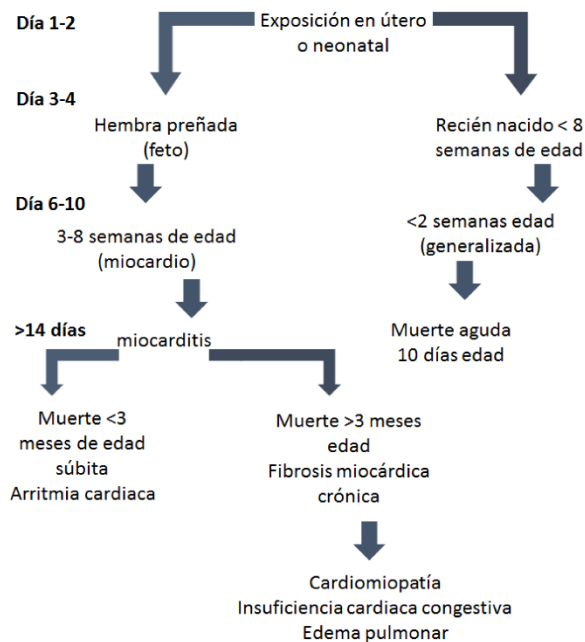
1.2.2. PATOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGIA

Parvovirus canino (PVC) es un virus altamente contagioso en perros y se puede diseminar a todos los tejidos a través de la circulación sanguínea. Las consecuencias de



la infección por PVC son la miocarditis, que resulta fatal en cachorros de 2 a 3 semanas de edad, y la enteritis hemorrágica (Pollock, 1982) (Figura 2).

a Hembras preñadas y cachorros



b Perros >8 semanas de edad

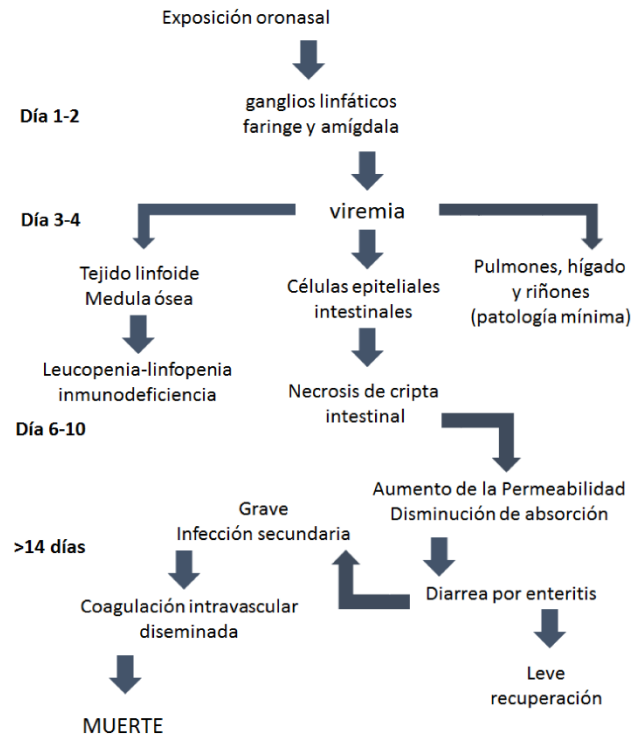


Figura 2. **a)** Curso clínico de la parvovirus canina según la edad del animal. **a)** hembras preñadas y cachorros; **b)** perros >8 semanas de edad.

El PVC tiene tropismo por las criptas intestinales y órganos linfoides, pero puede diseminarse a todos los tejidos (Pollock, 1982), incluyendo el cerebro. Después de la penetración por vía oro nasal, el virus se replica en tejidos gastroentéricos y es diseminado al epitelio germinal de las criptas del intestino, causando diarrea; también induce leucopenia y miocarditis. La forma clínica característica de la infección por PVC es la enteritis hemorrágica. Los signos clínicos ocurren posteriores a la incubación en un periodo de 3 a 7 días y consisten en anorexia, depresión, vómito y diarrea mucosanguinolenta, deshidratación y fiebre. La mortalidad se estima por arriba del 70-90% en cachorros y menos del 1% en perros adultos (Decaro *et al.*, 2012).



1.2.3. CICLO VIRAL

El Parvovirus canino tiene un genoma muy pequeño y por consecuencia es altamente dependiente de las funciones del hospedero para lograr una replicación exitosa. La infección inicia por la unión mediada por la cápside viral con uno o más receptores glucosilados en la superficie celular del hospedero seguido por la entrada del virión a la célula vía endocitosis con la finalidad de transportar a los viriones a regiones perinucleares y así iniciar su ciclo de replicación en núcleo (Cureton *et al.*, 2012).

1.2.3.1. RECONOCIMIENTO Y ENTRADA

PVC emplea el receptor celular de transferrina (TfR) para iniciar el proceso de entrada celular. Las cápsides virales entran en la célula hospedera mediante mecanismos de endocitosis que involucran a las clatrininas y es un paso necesario para que los viriones sean transportados a regiones perinucleares (Allison *et al.*, 2014).

Las proteínas estructurales (VP2) de PVC median la interacción entre el virus y el receptor celular de Transferrina tipo I (TfRI), una glucoproteína homodimérica transmembranal tipo I (Figura 3a). Cada monómero de TfRI tiene un dominio transmembranal y un dominio intracelular. Este receptor transporta hierro al interior de la célula por unión e internalización de hierro-cargado por transferrina, por endocitosis mediada por clatrina (Luck y Mason, 2012).

Cada monómero de TfR contiene un largo dominio extracelular compuesto por 3 distintas regiones (triskelión): una proteasa, un dominio apical y un dominio helical (Lawrence *et al.*, 1999) (Figura 3b). Algunos cambios en los residuos del dominio apical de TrF también influyen en la unión de virus (Goodman *et al.*, 2010) sugiriendo que la interacción cápside-receptor es compleja y dependiente de especificidad del hospedero y estructuras virales; si hay glucosilación del dominio apical de TfR potencialmente se inhibe la infección por PVC (Kaelber *et al.*, 2012).

Después del reconocimiento celular por su receptor TrF, el PVC es introducido a la célula vía endocitosis mediada por clatrina, como ya se mencionó, proceso facilitado por la dinamina (GTPasa). El resultado es la formación de un endosoma temprano, el cual tiene



un ambiente ácido ($\text{pH} < 6.2$) como resultado de la actividad vacuolar de bombas de H^{++} ATPasas. La transformación a endosoma tardío ocurre por un proceso mediado por los microtúbulos. El endosoma tardío después se fusiona a lisosomas, alcanzado un pH ácido ($\text{pH} < 5.3$) en el interior. Este mecanismo permite el reciclado del receptor TrF (Parker y Parrish, 2000) (Figura 3c). La actividad de la fosfolipasa PLA2 ayuda a la degradación del endosoma por modificación de la composición de su membrana lo que favorece la entrada de partículas virales al citoplasma (Marchini *et al.*, 2015).

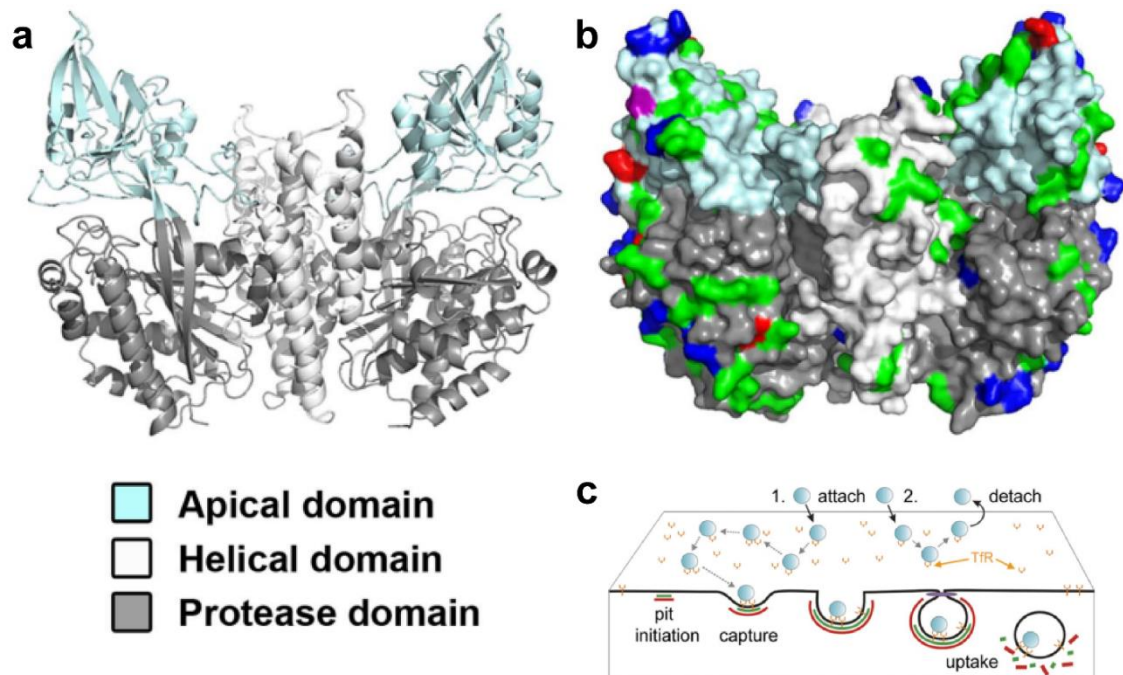


Figura 3. Estructura TrF y reconocimiento de PVC. **a) y b)** estructura cristalográfica de TrF, se muestran sus diferentes dominios estructurales. (Tomado de Allison *et al.*, 2014). **c)** Interacciones de PVC; menor cantidad y proximidad entre TrF, disminuye entrada de partículas de PVC. TrF es necesario en mayor cantidad formando un complejo que facilita la infección por PVC al permitir la entrada del virus por endocitosis. (Tomado de Cureton *et al.*, 2012).

1.2.3.2. TRÁFICO INTRACELULAR

El virus es transportado al interior de la célula a través de la red de microtúbulos. La entrada al núcleo es por los poros nucleares (NPC). La interacción del virus con las proteínas del NPC permite exponer la única secuencia de la proteína viral VP1 que contiene señales de localización nuclear (NLS) además del dominio de PLA2. Una vez dentro el PVC libera su ADN y comienza su replicación. Es necesario que la célula este



forzosamente en fase S del ciclo celular ya que requiere de los factores celulares de esta fase. El proceso de replicación comprende la conversión de la cadena sencilla de ADN a cadena doble. El ADN de doble cadena recién sintetizado se utiliza como molde para la síntesis de mRNA viral y para la formación de más moléculas de ADN. (Marchini *et al.*, 2015).

1.2.3.3. REPLICACIÓN

El proceso de replicación comprende la conversión de una cadena sencilla a una doble cadena de ADN viral, la forma replicativa de ADN. Cuando la célula hospedera entra en fase S, la harpina viral 3' actúa como un iniciador de cadena complementara en la síntesis de ADN, generando una doble cadena de ADN viral. La doble cadena de ADN recién sintetizada es usada como molde para la síntesis de RNAm. La replicación viral ocurre en estructuras bien definidas llamadas "cuerpos de replicación autónoma asociada a parvovirus (APAR) y requiere el reclutamiento de factores celulares como la proteína de replicación A (RPA), antígeno de replicación celular nuclear (PCDNA), DNA polimerasa α y δ y la ciclina A (Marchini *et al.*, 2015).

El ADN de doble cadena contiene 2 unidades de transcripción de RNAm, con promotores (P4 y P38) y un sitio de poliadenilación en el extremo 5' (Qiu *et al.*, 2006). Estos dos promotores conducen la expresión del gen no estructural (NS) codificado el extremo 3' del genoma y un gen de la cápside (VP) codificado en el extremo 5' (Figura 1b).

El transcrito R1 sintetizado a partir de P4 contiene un ORF (marco abierto de lectura) que codifica la NS1 (proteína iniciadora de replicación). El transcrito R2 codifica en orden de abundancia a NS2P, NS2Y y NS2L, donde el extremo C-terminal es diferente (Wang *et al.*, 1998). El transcrito R3 regula la síntesis de 2 proteínas primarias de la cápside, VP1, VP2 y VP3 (forma troncada de VP2). Cuando Parvovirus expresa ambas proteínas NS1 y alguna de las formas de NS2 se inicia el crecimiento del virus en la fase S (Cater y Pintel, 1992) (Figura 1b).

Subsecuente a la activación del promotor P4 y la expresión de NS1 y NS2 se recluta a los factores de transcripción EF, ATF/CREB, ETS y NF-Y los cuales están



sobreexpresados en células de replicación rápida. Algunos parvovirus están asociados con la inducción de respuesta a daño celular de ADN (DDR) con el consecuente arresto del ciclo celular favoreciendo la replicación viral. La proteína NS1 activa el promotor viral P38 induciendo la expresión de VP, una proteína de la cápside que guía la replicación y encapsidación de ADN viral.

Estos pasos del ciclo viral de parvovirus involucran interacciones directas de NS1 con varios factores celulares, incluyendo RPA y los factores de transcripción TBP, TFIIA y SP1/3. Así la célula hospedera controla y modula mecanismos de replicación viral y la expresión de genes virales, con el fin de establecer un control mediado por la respuesta inmune innata.

1.2.3.4. SALIDA

Después de la replicación las partículas virales tienen como objetivo poner su progenie fuera del núcleo, este proceso requiere de varias proteínas virales las cuales son recién sintetizadas. Las partículas virales pueden salir del núcleo por la ruptura de la membrana nuclear que se da posterior a lisis celular, terminando así el ensamblado del virión de PVC en el citoplasma. Esta ruptura es un proceso activo inducido por proteínas virales como NS1 y fracciones de VP2. (Cater y Pintel, 1992).

Al finalizar la expresión de las proteínas de la cápside, nuevos viriones son empaquetados para su salida de la célula mediante mecanismos activos los cuales permiten llevar los viriones del núcleo a la periferia celular. Recientemente se reportó que RoPV (Rodent protoparvovirus 1) sale de la célula hospedera por la formación de vesículas celulares en el retículo endoplásmico que son transportadas a la membrana a través del aparato de Golgi a través de una ruta gelsolin dependiente. El transporte desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi es mediado por proteínas celulares como moesina y radixina, siendo esto un paso importante en la infección viral; este transporte vesicular acelera la salida de partículas virales infectantes. (Cater y Pintel, 1992).



1.3. INTERACCIÓN PVC-CÉLULA HOSPEDERA

La mitocondria es un organelo importante en la producción de energía, regula el balance redox, mantiene la homeostasis de calcio y también regula la respuesta celular ante diferentes situaciones de daño o estrés celular (Rasola y Bernardi, 2007; Murgia *et al.*, 2009 y Galluzi *et al.*, 2012). En las infecciones virales la mitocondria juega un papel importante al activar cascadas de señalización de activación de IFN (Galluzi *et al.*, 2012). Varias proteínas virales se unen a la mitocondria e interfieren con sus funciones contribuyendo a la replicación viral. El funcionamiento de la mitocondria es crucial para la sobrevivencia celular. Se sabe que los Parvovirus inducen apoptosis en células infectadas, pero el rol de la mitocondria durante la infección por PVC es solo parcialmente conocido. Nykky y colaboradores demostraron mediante microscopia electrónica y confocal que PVC se asocia a la membrana mitocondrial externa en etapas tempranas de infección (Figura 4).

Durante la entrada de PVC existe una despolarización temprana del potencial de membrana mitocondrial con incremento de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno). Subsecuentemente la homeostasis mitocondrial tiene un periodo de normalización, seguido de una repolarización de la membrana mitocondrial y un decremento de ROS. Posterior a la activación inicial de la membrana mitocondrial se activa la cascada de ERK1/2 en etapas tempranas de infección por PVC. Horas después de la infección se empieza a tener expresión de la proteína NS1, esto produce también daño en la integridad mitocondrial y despolarización de su membrana. Estos hallazgos proveen indicios sobre la patogénesis de PVC e información general sobre la asociación virus-mitocondria (Nykky *et al.*, 2014).

PVC parece afectar a la mitocondria ocasionando disfunción, esto puede ser debido a una interacción directa del virus con la mitocondria. PVC se asocia a la mitocondria de 2 a 24 horas postinfección, pero no se observa dentro de la mitocondria (Figura 4). La cantidad de virus asociados con la mitocondria incrementa a las 16 horas postinfección; durante este tiempo nuevos virus se han ensamblado y la cantidad de virus intracelulares se han incrementado, probablemente aumentando la asociación de PVC con la mitocondria. PVC se mantiene asociado solo en la membrana externa mitocondrial



(Figura 4) y no en la membrana mitocondrial interna la cual contiene a COX IV (Cytochrome c Oxidase Subunit IV) (Figura 5a) (Nykyk *et al.*, 2014).

La activación de ERK puede producir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en estadios tempranos de infección ocasionando un daño irreversible en la mitocondria (Figura 5a, 5b y 5c). La localización de las proteínas virales en la mitocondria ha sido reportada en virus como HCV, RSV, rotavirus, HIV y virus herpes simple (Saffran *et al.*, 2007).

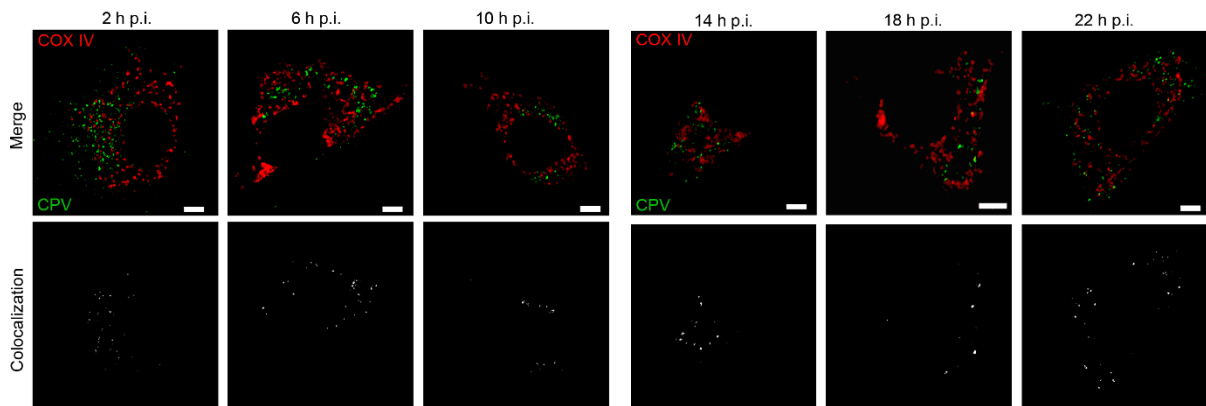


Figura 4. Colocalización PVC-mitocondria. Mediante microscopia confocal PVC se colocaliza con la mitocondria en las primeras horas de infección (2 a 6 hrs). La mitocondria es lavada con anti-COX IV (rojo) y PVC con anti-capsid (verde). La colocalización de PVC con la mitocondria se muestra en blanco en las imagenes inferiores. Tiempo de infección de 2 a 22 horas. (Tomado de Nykyk *et al.*, 2014).

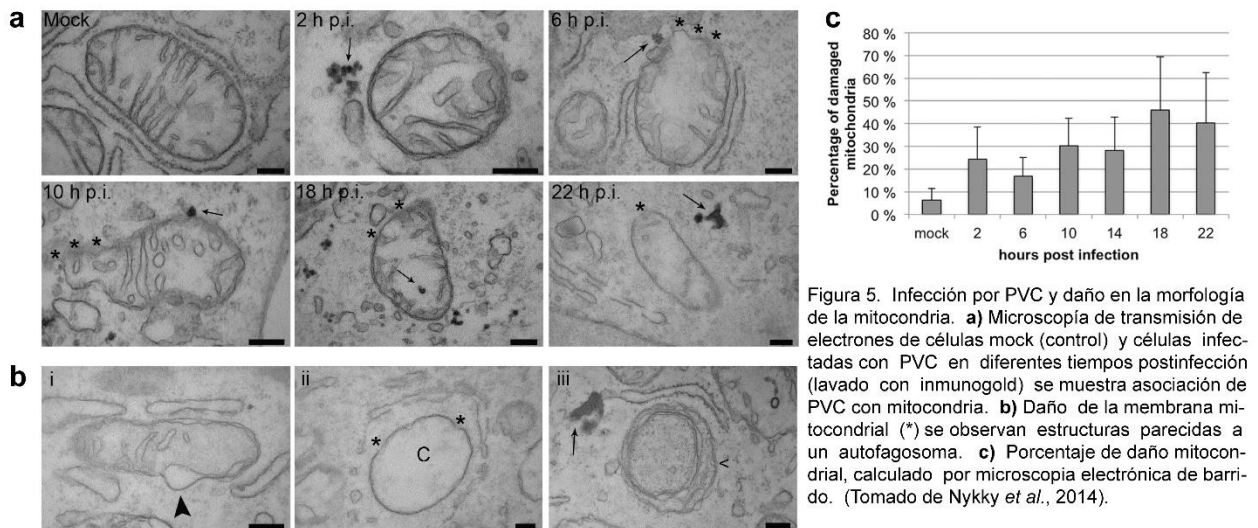


Figura 5. Infección por PVC y daño en la morfología de la mitocondria. **a)** Microscopia de transmisión de electrones de células mock (control) y células infectadas con PVC en diferentes tiempos postinfección (lavado con inmunogold) se muestra asociación de PVC con mitocondria. **b)** Daño de la membrana mitocondrial (*) se observan estructuras parecidas a un autofagosoma. **c)** Porcentaje de daño mitocondrial, calculado por microscopia electrónica de barrido. (Tomado de Nykyk *et al.*, 2014).



En el caso de PVC, la despolarización mitocondrial comienza a las 2 horas post-infección (Figura 6a). A las 4 horas post-infección se restaura el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y hay de nuevo despolarización a las 14 horas post-infección (figura 6a). Los niveles intracelulares de ROS durante la infección por PVC han sido analizados y se ve un aumento al inicio de la infección (Figura 6b). La cantidad en las células infectadas se incrementa a las 2 horas, continuando así hasta las 6 horas post-infección, a las 8-22 horas post-infección los niveles de ROS regresan parcialmente al nivel de las células control para finalmente incrementarse de nuevo a las 24 horas. Estos resultados muestran que la mitocondria es afectada durante la entrada de PVC, pero las células son capaces de recuperarse del estrés oxidativo (Nykyk *et al.*, 2014).

El incremento en el daño en la mitocondria (Figura 5 y 6) y en su ADN (Nykyk *et al.*, 2014) puede verse posterior a la expresión de proteínas virales especialmente de NS1, después de 12 horas post-infección. Como ya se mencionó el PVC parece estar asociado con la mitocondria directamente, aunque esta asociación no es la misma que induce muerte celular. El daño temprano en la mitocondria, ocurrido a las 2 horas post-infección (Figura 6a), la producción de ROS (figura 6b) y la activación de caspasas indica que la infección viral es sensada por el hospedero y sus células responden no solo activando la vía intrínseca de muerte sino también de sobrevivencia celular (Nykyk *et al.*, 2010 y 2014).

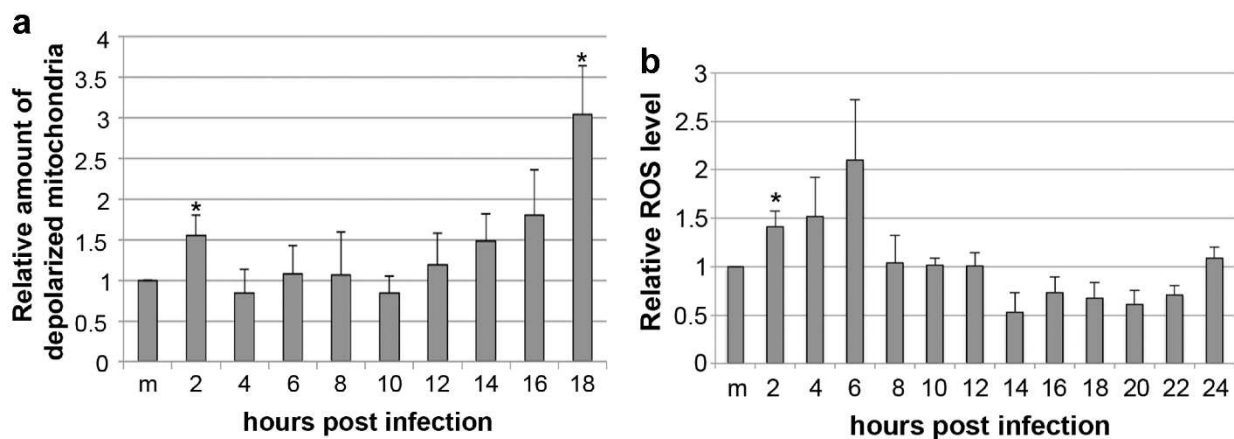


Figura 6. **a)** Pérdida bifásica del potencial de membrana durante la infección por PVC ($p < 0.05$). **b)** Producción de ROS durante la infección por PVC ($p < 0.05$). (Tomado de Nykyk *et al.*, 2014).



1.4. MECANISMOS INMUNES DE CONTROL VIRAL

Las células que son infectadas por microorganismos activan respuestas inflamatorias. El sensado inicial es mediado por PRRs (Receptores de Reconocimiento de Patógenos) que sensan PAMPs y DAMPs (Patrones Moleculares Asociados al Patógeno y Patrones Moleculares Asociados a Daño, respectivamente) durante una infección. Existen varias clases de PRRs con distintas funciones: TLRs (Receptores Tipo Toll), RLH-RIGI (Receptores tipo Helicasa), Receptores tipo NOD y receptores tipo Lectina C (Lee y Kim, 2007; Medzhitov, 2007; Meylan y Tschopp, 2006; Takeuchi y Akira, 2007). La señalización intracelular iniciada por estos PRRs permite expresión transcripcional de mediadores inflamatorios que coordinan la eliminación de los patógenos de las células hospederas.

1.4.1. SMOCS

Las diversas familias de receptores del sistema inmune innato activan la traducción de señales que son importantes en la defensa del hospedero, se han observado bases estructurales y biológicas que proponen el concepto de Centros Supramoleculares de Organización (SMOCS), Kagan y colaboradores en 2014 proponen que estos centros son ensamblados en varios organelos o en sitios extracelulares, y sirven para amplificar la señal y potenciar la especificidad celular en respuesta inducida por patógenos infecciosos o no infecciosos (virus o bacterias) (Kagan *et al.*, 2014). La visión clásica de la transducción de señales involucra reacciones en serie con cada uno de los ligandos específicos los cuales inducen un cambio conformacional en sus receptores con la consecuente activación de enzimas y generación de segundos mensajeros (Chia-Yi *et al.*, 2010).

La señalización iniciada ante un estímulo adverso por un virus puede ser desencadenado por la activación mediante PAMPs y diversos PRRs, tales como TLRs (Receptores Toll) con más de 100 genes que han sido identificados que regulan la señalización por estos factores (Yamamoto *et al.*, 2003a, 2003b; Oshium *et al.*, 2003a, 2003b; Horng *et al.*, 2002). Otra vía de señalización es por los receptores citosólicos tipo NOD (NLRs), y finalmente la vía de receptores tipo RIG (RLRs) (Kumar *et al.*, 2011) (Tabla 2, figura 7).



Tabla 2. Respuesta inmune innata – SMOCS

SMOC	Ligandos	Receptores	Adaptadores	Efectores	Funciones
FAS DISC	FAS ligando	FAS	FADD	Caspasa 8	Apoptosis
PIDDosoma	Daño ADN	PIDD	RAIDD	Caspasa 2	Apoptosis
Myddosoma	PAMPS	TLRs	TIRAP MYD88	IRAKs	Activación NF-Kb
Complejo RLR	RNA o ADN viral	RIG I MDA5	MAVS	TRAFs	Activación NF-Kβ e IFN
Inflamasoma	PAMPs y DAMPs	NLRs ALRs	ASC	Caspasa 1	Piroptosis y metilación de IL-1β

(Tomado y modificado de Kagan et al., 2014).

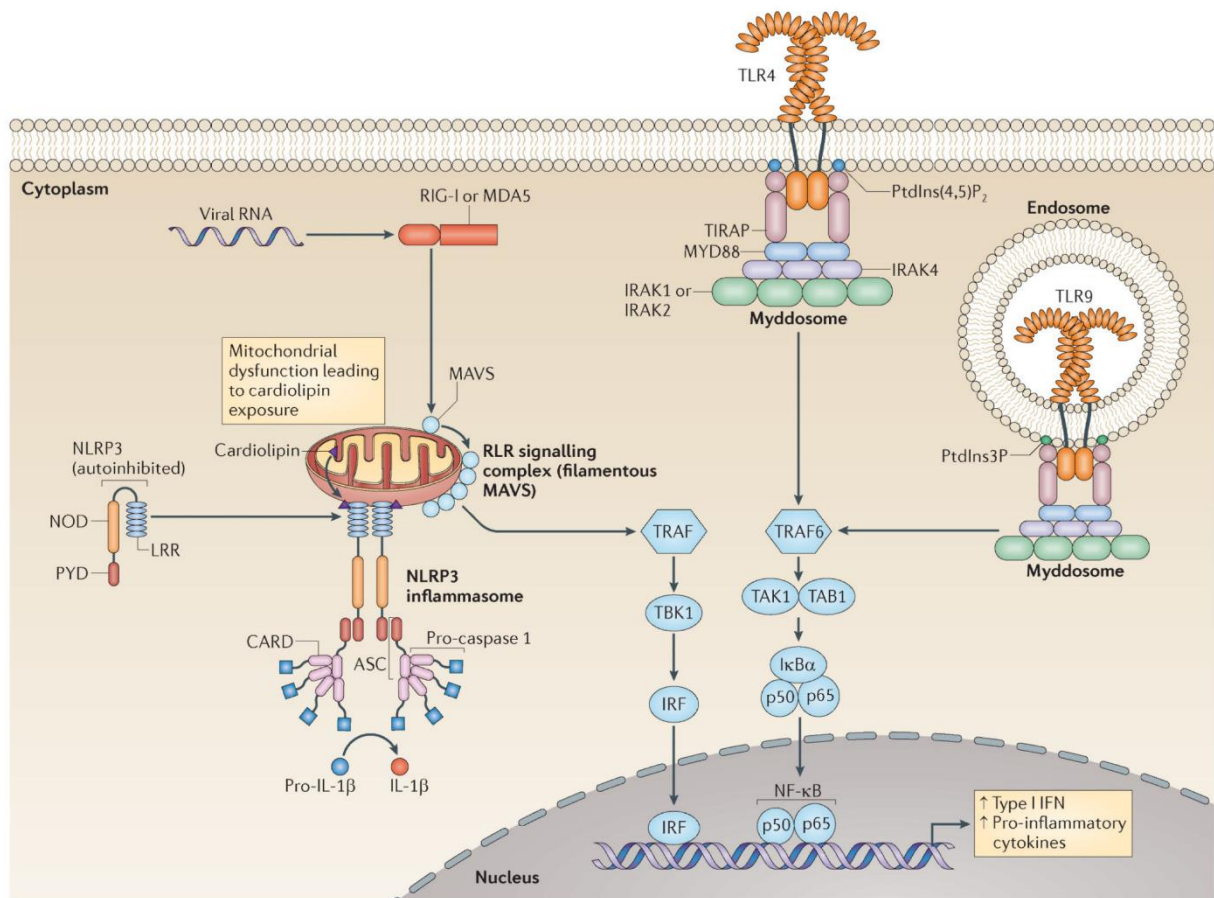


Figura 7. Formación de SMOCs por TLRs, RLR y NLRs. Los SMOCs incluyen ligandos y proteínas reguladoras que promueven su ensamblado induciendo corriente abajo diversas actividades biológicas. TLR4 permite el ensamblado del myddosoma en la membrana plasmática. TLR9 ensambla el myddosoma endosomal. El adaptador específico para TLR contiene un adaptador proteico Toll/IL1R llamado TIRAP que facilita el ensamblado del myddosoma. La unión con cardiolipina transloca a la membrana mitocondrial externa ocasionando una disfunción mitocondrial, cambiando a un estado autoinhibidor de NOD, LRR y NLRP3. Este cambio es promovido por el ensamblado del inflammasoma NLRP3 reclutando caspasas. La activación por receptores RIG I o MDA5 permite la conformación de MAVS señal inicial de la secreción de IFN. (Tomado de Kagan et al., 2014).



Ejemplos de las familias de PRRs (TLRs, RLRs y NLRs) muestran que el ensamblado de SMOCs ocurre en las membranas incluso cuando los receptores iniciadores sean proteínas citosólicas. En cada caso una proteína de membrana inicia la formación del complejo que activa específicamente la respuesta inmune innata. Una explicación biofísica de la localización aparente de SMOCs puede ser por la necesidad energética y el enlace proteína-proteína que debe ser bidimensional sobre la membrana (Wu *et al.*, 2011). Por esta razón los futuros estudios de los mecanismos bioquímicos del ensamblado de SMOCs y sus funciones se centrarán en los sitios subcelulares donde ocurre dicho ensamblado. Así se sabrá si los SMOCs están involucrados en operar solo en determinados organelos. El análisis biológico puede revelar importantes puntos de control y manipulación del ensamblado de SMOCs y su subsecuente respuesta inflamatoria (Kagan *et al.*, 2014).

1.4.2. MYDDOSOMA Y RECEPTORES TIPO TOLL

Aunque el myddosoma ha sido definido estructuralmente (Lin *et al.*, 2010), aún la información de su composición, dinámica y regulación endógena inducida por TLR en células de mamíferos es incompleta. Se ha demostrado el desarrollo del myddosoma en macrófagos, con la formación en la membrana de endosomas (Bonham *et al.*, 2014). Por ejemplo, con el tratamiento con LPS (lipopolisacárido) en macrófagos activados por TLR4 permite el ensamblado del myddosoma en la superficie celular; por otro lado, un CpG sin metilar que contiene oligonucleótidos DNA activa TLR9 y permite el ensamblado del myddosoma endosomal (Hristov *et al.*, 2010).

La proteína TIRAP es necesaria para el ensamblado del myddosoma (Bonham *et al.*, 2014); esta proteína es el primer regulador natural del myddosoma inducido por TLR. TIRAP es una proteína de membrana periférica que contiene en su porción N-terminal un lípido de unión que interactúa con ácido fosfoinositol y fosfatidilserina. Esta interacción le permite tener subdominios en la membrana plasmática y en el endosoma (unión-ligando). TIRAP al detectar una unión al ligando TLR en la porción carboxilo-terminal recluta el mayor componente del myddosoma, el MYD88 que inicia la formación de este SMOC a través de su interacción con IRAKs (figura 7) (Motshwene *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014).



1.4.3. INFLAMASOMA Y RECEPTORES TIPO NOD

El sistema NLR es otro ejemplo del ensamblado de SMOCs sobre membranas, al menos en el caso de NOD, LRR y NLRP3. NLRP3 es una proteína del citosol que se transloca a la mitocondria cuando las células son estimuladas con varios tipos de activadores de inflammasomas (Zhou *et al.*, 2011; Misawa *et al.*, 2013). La translocación de NLRP3 a la mitocondria ha sido reportado que ocurre debido a las interacciones con cardiolipina, que es solo desplegada sobre la membrana externa por daño en la mitocondria (Iyer *et al.*, 2013) o por MAVS (Proteína Mitocondrial de Señalamiento Antiviral) (Subramanian *et al.*, 2013). NLRP3 es parecido a TIRAP ya que es capaz de promover el ensamblado de SMOCs y puede interactuar con ambos lípidos a través de la membrana (fosfoinositol) y proteínas (TLRs) en una región específica de la célula (figura 7) (Danial y Korsmeyer, 2004).

1.4.4. RECEPTORES TIPO RIG

Los RLH incluyen a RIG-I (Inductor de Ácido Retinoico Intracelular gen I), MDA5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma) y LGP2 (regulador de RIG I) (Yoneyama y Fujita, 2008; Takeuchi y Akira, 2009). Su estructura comprende un dominio de reclutamiento de caspasa N-terminal (CARD), un dominio helicasa (DEXD/H) y un dominio C-terminal. Los RLHs sensan intracelularmente RNA o DNA viral e inician la respuesta antiviral vía IFN (Andrejeva *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2004). RIG I se une al RNA o DNA viral iniciando cambios conformacionales que exponen a CARD para la subsecuente señalización (Seth *et al.*, 2005; Takeuchi y Akira, 2010) (Figura 7, 8a y 8b).

El sistema RLR ensambla SMOC sobre las membranas. El núcleo de la inducción de RLR es MAVS que está localizada en las membranas con un dominio C-terminal transmembrana (Seth *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2011). La localización del dominio de MAVS es estructuralmente similar a TIRAP, sus dominios son similares y pueden ser reconocidos en múltiples organelos. MAVS tiene un dominio transmembrana que permite su localización en la mitocondria, en peroxisomas y en membranas asociadas a mitocondria (MAMs) del retículo endoplásmico (Seth *et al.*, 2005; Dixit *et al.*, 2010; Horner



et al., 2011). Esto permite que el SMOC sea ensamblado de igual manera en mitocondria, peroxisomas o MAMs durante infecciones virales (Takeuchi y Akira, 2010) (Figura 8a y 8b). Las moléculas adaptadoras que ayudan a la unión entre los RLH y desencadenan los eventos siguientes, se identifican por contener dominios CARD (Seth *et al.*, 2005).

El IFN- β induce la activación de la proteína IPS-1 (I interferon- β promoter stimulator 1) (Kawai *et al.*, 2005), la cual media la señalización de la respuesta antiviral. Por su parte el virus induce la señalización de un adaptador viral (VISA) (Xu *et al.*, 2008) y CARD inducido por IFN- β (Cardif) (Meylan *et al.*, 2005).

MAVS transduce señales de RIG-I y MDA5 mediante interacción CARD-CARD, lo que permite la activación del IRF-3 (Factor Regulador de Interferón 3) y NF- κ B, induciendo la activación del IFN β a través de la cascada de señalización que involucra IKK α / β / γ , IKK ϵ y TBK1 (Lee y Kim, 2007). Recientemente una proteína denominada STING (Ishikawa y Barber, 2008) o MITA (Zhong *et al.*, 2008) fue identificada como un mediador de los eventos ocurridos posterior a activación de RIG-I y TBK1 (figura 7, 8a y 8b).

La conformación RIG-I está modulada por su ubiquitinación por TRIM25 y RNF135 que actúan como E3 ubiquitin ligasas que median la poliubiquitinación ligada a K63 de RIG-I (Gack *et al.*, 2007, Pichlmair *et al.*, 2009). Esta modificación es necesaria para la activación de la señalización RLR. Por otra parte, la poliubiquitinación de tipo K48 de RIG-I por RNF125 conduce a degradación de RIG-I por el proteosoma e inhibición de la señalización RIG-I (Arimoto *et al.*, 2007)

Los dominios CARD de los RLRs son responsables de desencadenar la cascada de señalización al interactuar con los dominios CARD N-terminal presentes en IPS-1 (también conocido como MAVS, CARDIF o VISA) (Kawai y Akira, 2006).

IPS-1 se localiza en la membrana mitocondrial, y la escisión de IPS-1 resulta en la abrogación de la señalización RLR. NLRX1 (también conocido como NOD9), un miembro de la familia NLR, se localiza en la membrana mitocondrial y actúa como un inhibidor de IPS-1 (Moore *et al.*, 2008). IPS-1 activa TRAF3 y TRADD (Michallet *et al.*, 2008), las moléculas de señalización corriente abajo para la expresión de genes inducibles por IFN. IPS-1 comparte vías de señalización con TRIF. (Michallet *et al.*, 2008).



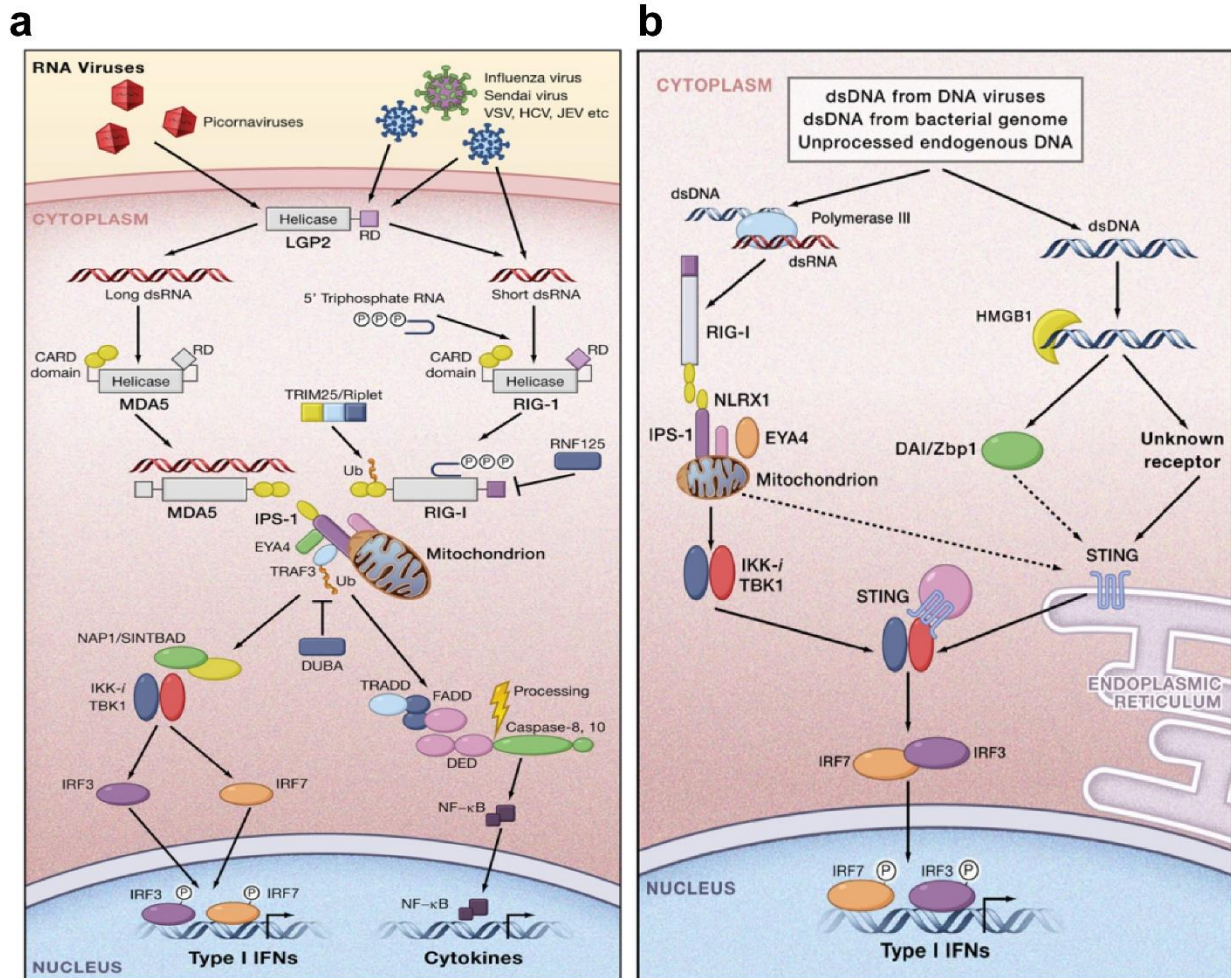


Figura 8. Reconocimiento viral por RIG-I-MDA5. **a)** RIG-I y MDA5 reconocen diferentes tipos de virus mediante detección de cadenas largas o cortas de ADN o RNA viral respectivamente. **b)** LGP2 es un regulador positivo de RIG-I y MDA5. La activación de RIG-I es positivamente y negativamente regulada por lipasas de ubiquitina TRIM25 y RNF125 respectivamente. RIG-I y MDA5 interactúan con MAVS que está unido a dominios CARD. MAVS activa las cascadas de señalización permitiendo la expresión de IFN, vía TRAF3, NAP1, TBK1, IKK e IRF3 y 7. La señalización por RLRs media la poliubiquitinación de TRAF3 induciendo translocación de NF- κ B vía TRADD y FADD. (Tomado de Takeuchi y Akira, 2010).

Todas estas evidencias moleculares muestran que RIG I/MDA5 tienen un amplio rango de funciones que llevan a cabo para lograr la activación y producción de IFN por lo cual es un SMOG importante en la regulación de la respuesta inmune del hospedero ante infecciones virales ya sean por virus RNA o ADN de cadena sencilla o cadena doble (Takeuchi y Akira, 2010).

1.5. MITOCONDRIA E INMUNIDAD INNATA

La mitocondria es un organelo celular involucrado en el metabolismo celular del hospedero y también regula el control de la muerte celular programada. La mitocondria está compartimentalizada por una bимembrana, posee su propio genoma mitocondrial circular (mtDNA), que codifica para 13 genes que son esenciales para la función respiratoria y para la generación de ATP. (Attardi y Schatz, 1988).

Un descubrimiento importante la década pasada fue que la mitocondria tiene una misión en la inmunidad antiviral innata en los vertebrados particularmente los mamíferos (Seth *et al.*, 2005; West *et al.*, 2011). Además de participar activamente en numerosos procesos celulares, como la homeostasis del calcio, apoptosis y múltiples señalizaciones (Rutter y Rizzuto, 2000; Gunter *et al.*, 2004; Leo *et al.*, 2005).

Existe una asociación directa entre la mitocondria y la señalización de la respuesta inmune innata teniendo como primer operador a MAVS. Recientemente otras moléculas de la respuesta inmune innata como NLRX1, TRAF6, NLRP3 e IRGM han sido asociadas funcionalmente con la mitocondria (Arnoult *et al.*, 2011). Existen líneas de estudio que toman a la mitocondria y sus funciones, como un regulador importante de la respuesta inmune innata del hospedero, así mismo el consumo de oxígeno, producción de ATP y las vías de biosíntesis que dependen de la actividad y aptitud de la mitocondria (Arnoult *et al.*, 2009 y 2011).

La molécula energética más importante en la célula es el ATP, que es generado a través de la fosforilación oxidativa o en la glucólisis. La fosforilación oxidativa requiere la presencia de oxígeno, mientras que en la glucólisis se requieren condiciones anaeróbicas. Las células dendríticas al ser estimuladas por varios agonistas de los receptores TLR incrementan su producción de lactato, aumentan la expresión del transportador 1 de glucosa y disminuyen su consumo de oxígeno (Krawczyk *et al.*, 2010). Un incremento marcado de ATP por la glucólisis es importante para la función de los macrófagos, incluso se sugiere que la glucólisis puede ser un mecanismo protector del estímulo inflamatorio (Garedew *et al.*, 2010). La estimulación de IFN γ resulta en



disfunción mitocondrial dependiente de óxido nítrico, llevando a un colapso del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y apoptosis. El IFN γ activa macrófagos como resultado de producción glucolítica de ATP, lo que mantiene el $\Delta\Psi_m$, previniendo con ello la apoptosis celular. La regulación del metabolismo por fosforilación oxidativa y glucólisis parece ser crítico en la activación y protección de las poblaciones de células inmunitarias (Garedew *et al.*, 2010).

1.5.1. MITOCONDRIA Y VIRUS

Varios virus bloquean la apoptosis dependiente de mitocondria, incluyendo la proteína BCL2 (adenovirus E1B), proteína BHRF1 (Epstein-Barr), F1L y N1L (citomegalovirus). Estos virus bloquean la apoptosis al interferir con las proteínas pro-apotóticas BAK y BAX de la membrana mitocondrial externa (Wasilenko *et al.*, 2003; Kvensakul *et al.*, 2007). Otro grupo de virus promueve la apoptosis celular como un mecanismo de patogenicidad. La proteína R del VIH-1, interactúa con la proteína de la membrana mitocondrial externa VDAC, resultando en la apertura de un poro mitocondrial de transición permeable (Mptp), pérdida del potencial de membrana interno ($\Delta\Psi_m$) y fugas de factores apoptogénicos hacia el citosol (Jacotot *et al.*, 2000).

1.5.2. VÍA ACTIVACIÓN-MAVS

La ruta de RIG-I/MDA5 (familia RLR) involucra sus dominios CARD y su capacidad de sensor RNA y/o DNA viral (Yoneyama *et al.*, 2004; Yoneyama y Fujita, 2008). La unión con sus ligandos específicos permite que estos RLR adquieran actividad de ATPasa, lo cual es requerido para inducir cambios conformacionales que permitan la exposición de CARDS, ocultos por el dominio regulatorio carboxilo terminal. Este cambio conformacional es necesario para la interacción del dominio CARD con el adaptador mitocondrial MAVS (también llamado IPS1, Cardif o VISA) (Kawai *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005) (Figura 9a).

La proteína MAVS contiene un CARD en la porción N-terminal requerido para la señalización, un dominio enriquecido de prolina que interactúa con TRAF3 y TRAF 6



(Receptor Asociado al Factor de Necrosis Tumoral 3 y 6), y una región C-terminal transmembrana (Moore y Ting, 2008) (figura 9a, 9b). Varias proteínas virales tienen como objetivo a MAVS dada su participación en la producción de IFN. La ruptura o desacoplamiento de MAVS por algunos virus, resulta en la pérdida de su localización mitocondrial, rompiendo así la inducción de IFN (Rebsamen *et al.*, 2008; Scott y Norris, 2008).

Los reportes más recientes indican que la polimerización de MAVS, puede ser el mecanismo que permite el ensamblado de complejos filamentosos mediante los cuales se estimula la respuesta inmune innata durante las infecciones virales. El mecanismo descrito involucra a la proteína sensora RIG-I (receptor), la cual es activada primero por la presencia de su ligando (ADN o ARN viral) para después oligomerizarse. El sensor oligomerizado proporciona una plataforma para la polimerización de proteínas, así CARD-RIGI forman un tetrámero que inicia la polimerización de MAVS a través de CARDS promoviendo la señalización (Arnoult *et al.*, 2011; Kagan *et al.*, 2014) (figura 9c y 9d).

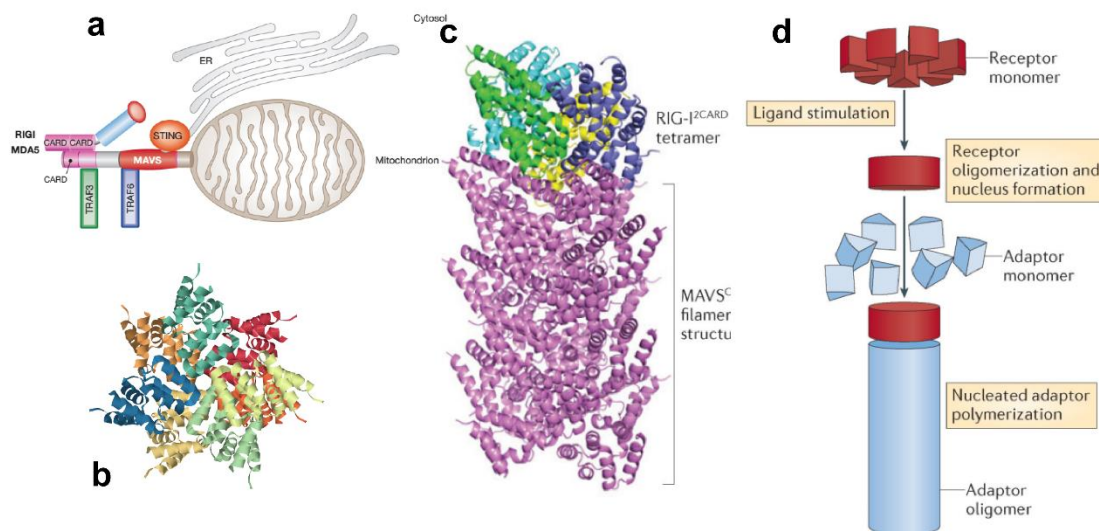


Figura 9. Interacción de RIG-I y MAVS. **a)** La región amino-terminal de RIG-I y MDA5 contiene 2 dominios CARD que interactúan con el dominio CARD del adaptador MAVS, posterior al reclutamiento de los transactivadores se induce la fosforilación de IRF3 e IRF7 permitiendo la producción de IFN tipo I. **b)** Reconstrucción MAVS. **c)** Estructura polimerizada (MAVS-CARD) morado, en complejo con RIG-I y su doble CARD (RIG-1, 2 CARD) tetrámero (azul, cian, verde y amarillo) durante un estímulo viral. **d)** Mecanismo propuesto mediante polimerización para la formación de MAVS-CARD. Los monómeros de RIG-I se muestran en fragmentos rojos y las formas oligomerizadas de RIG-I en discos rojos. Los monómeros del adaptador MAVS se muestran en fragmentos azules y los cilindros azules para la forma filamerosa. (Tomado de Arnoult *et al.*, 2011 y Kagan *et al.*, 2014).

En una infección los virus son rápidamente detectados por el sistema inmune, estos receptores reconocen componentes virales y activan directamente el sistema inmune. En la activación por TLRs se recluta un adaptador MYD88 y TRIF que permiten la cascada de señalización y producción de proteínas proinflamatorias como IFNs y quimiocinas (Akira y Takeda, 2004). MyD88 y TRIF producen IFN después de la infección con cierto número de virus, sugiriendo que el sistema TLR no es crucial siempre en la defensa innata viral (Kato *et al.*, 2005).

El ARN y ADN viral citosólico son reconocidos por RIG-I, MDA5, DAI u otros sensores aún desconocidos. El ADN de doble cadena citosólico se reconoce por receptores de ADN citosólicos tales como DAI, o, en otra vía, la ARN polimerasa III (Pol-III) dependiente del ADN citosólico sintetiza 5'- Trifosfato de ARN monocatenario, que es reconocido por RIG-I. Por otra parte, RIG-I y MDA5 reconocen ARN de doble cadena viral (ARNdc) largo o corto o 5'-trifosfato de ARN monocatenario (ssRNA) a través de su dominio helicasa C-terminal. Los dos dominios N-terminal (CARDs) reclutadores de caspasas, a continuación, interactúan con el dominio N-terminal CARD de la MAVS (IPS-1, Cardif, o VISA) (Ohta y Nishiyama, 2011) (figura 10).

Anclado a las mitocondrias a través de un dominio transmembrana C-terminal, MAVS recibe señales de RLRs a través de un CARD y transduce la señal hacia las proteínas corriente abajo a través de regiones ricas en prolina que interactúan con TRAF2 y TRAF3 y una región central que interactúa con TRADD y TRAF6. TRAF2 y TRAF3 interactúan con TANK. TANK recluta un complejo de quinasa compuesto de TANK-TBK1 e IKK ϵ , que fosforila IRF3 y la activación la transcripción de IFN- β (Ohta y Nishiyama, 2011) (figura 10).

TRADD interactúa con TRAF3 y Rip1, mientras que TRAF6 interactúa con Rip1. Rip1 media las señales entre la proteína asociada a Fas con el dominio de muerte (FADD) e IKK α e IKK β , dando lugar a la activación del factor de transcripción NF- κ B. Las interacciones entre LGP2 y MAVS o RIG-I antagonizan RIG-I/MAVS (Ohta y Nishiyama, 2011) (figura 10).

Por otro lado, MAVS mediante el reclutamiento de TRAF 3 y TRAF6, activa dos complejos proteín-quinasa en citosol: el IKK-quinasa 1 (TBK1) o IKK- ι/ϵ asociado a varias proteínas



adaptadoras como TANK, NAP1 y NEMO; o uno que comprende IKK α , IKK β y NEMO (Takeuchi y Akira, 2010). El complejo TBK1 induce la fosforilación y dimerización de los factores de transcripción IRF3 e IRF7, los cuales son translocados al núcleo y se unen a ISREs (Elementos de Respuesta a Estimulo de INF), esto resulta en expresión de genes de IFN tipo I. El complejo IKK activa NF- κ B promoviendo la expresión de citocinas proinflamatorias. La inducción mitocondrial involucra la vía de señalización RIG-I/MAVS (Arnoult *et al.*, 2011; Ohta y Nishiyama, 2011) (figura 10).

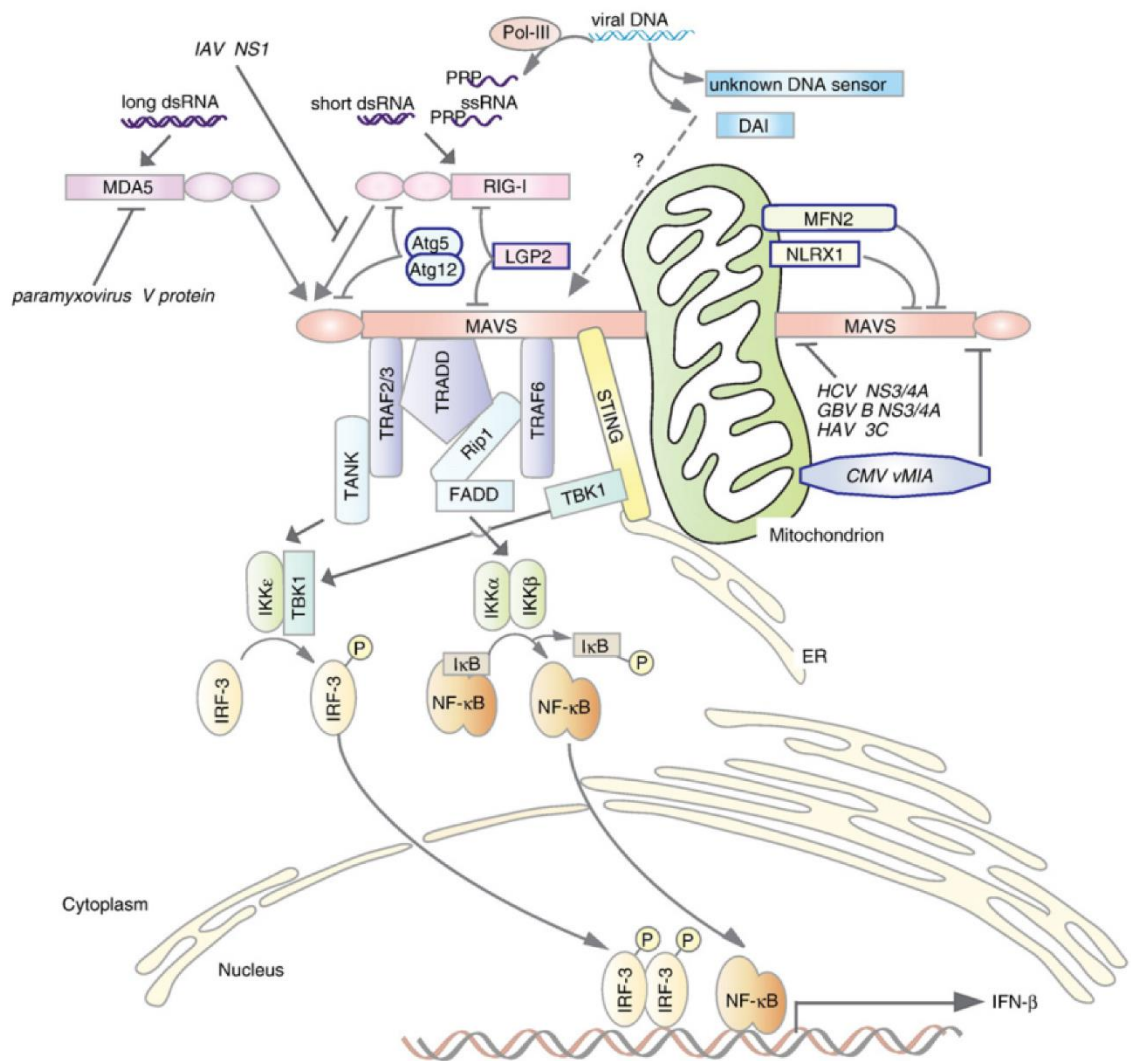


Figura 10. RLR media el reconocimiento viral y la producción de IFN β . (Tomado de Ohta y Nishiyama, 2011)

1.5.3. MAVS Y REGULACIÓN ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Además de la vía clásica de activación de MAVS (RIG-I/MDA5) se puede fosforilar IRF3 mediante TRAF3 y NEMO (Zeng *et al.*, 2009); en este modelo NEMO es un sensor de cadenas de poliubiquitina Lys 63 que activan TBK1 (Figura 11). La ligasa de ubiquitina E3 o ligasas mediadas por IRF3 son activadas por MAVS o por TRAF3 (Op De Beeck *et al.*, 2001).

MAVS debe estar localizado en la mitocondria para ejercer su función, lo que sugiere que el ambiente mitocondrial es requerido para la traducción de señales. MFN1 (efector de fusión de la maquinaria mitocondrial) regula positivamente a MAVS y media la respuesta antiviral innata (Castanier *et al.*, 2010; Onoguchi *et al.*, 2010). MAVS muestra interacción con MFN1, después de la activación por un RLR. El complejo MFN1-MAVS regula la redistribución de MAVS a lo largo de la mitocondria (Onoguchi *et al.*, 2010) originando una elongación de la red mitocondrial (Castanier *et al.*, 2010) (Figura 11). Esto es mediante el inicio de la activación de un RLR que se asocia con MAVS y con STING, un adaptador de señal antiviral localizado en la membrana del retículo endoplásmico (Ishikawa y Barber, 2008). Así MFN1 es un regulador positivo en la vía de RLR. MFN2 es un inhibidor directo de MAVS, el cual tiene una función similar que MFN1 sobre la fusión mitocondrial (Chan, 2006) (Figura 11).

La identificación de MAVS como un adaptador central de la vía RLR, que se localiza en la membrana mitocondrial externa provee información acerca de la estrecha relación entre las funciones mitocondriales y la señalización del sistema inmune (Figura 12). Evidencia molecular demuestra que varias vías de defensa del hospedero son controladas por este organelo (Okabe, 2009; Arnoult *et al.*, 2011).

Otra característica funcional de MAVS es, inducir la interrupción del potencial de membrana mitocondrial y activar las caspasas. Diferentes dominios de esta molécula son requeridos para la inducción de la citotoxicidad y producción de IFN (figura 12). En la mitocondria convergen múltiples vías del sistema inmune lo que ayuda al hospedero a integrar una respuesta funcional ante infecciones no solo virales sino bacterianas y de estrés producido durante cambios metabólicos (Arnoult *et al.*, 2011).



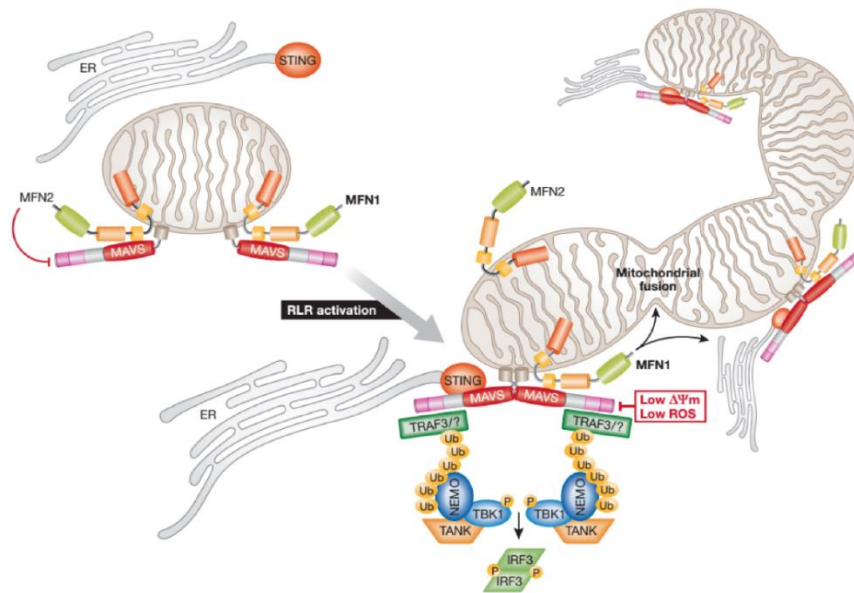


Figura 11. Dinámica mitocondrial e inmunidad innata. En la membrana externa mitocondrial MAVS interactúa con MFN1 y MFN2. MFN2 es un inhibidor directo de MAVS. La activación por RLR induce la oligomerización de MAVS y se recluta TRAF3 y ligasas de ubiquitina E3 que cataliza la poliubiquitinación de proteínas marcadas, incluyendo TRAF3. Las cadenas de poliubiquitina reclutan TANK y NEMO, que activan TBK1, permitiendo la fosforilación de IRF3. Simultáneamente MFN1 inicia la redistribución de MAVS a lo largo de la mitocondria haciendo una fusión mitocondrial formando una red que promueve la interacción entre MAVS y STING. (Tomado de Arnoult *et al.*, 2011).

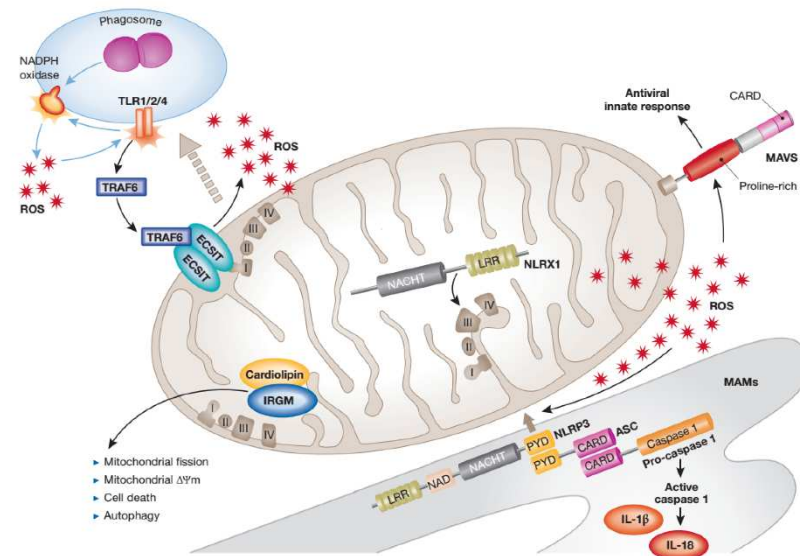


Figura 12. Señalización de la respuesta inmune en la mitocondria. Por inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), NLRP3 se localiza en la membrana del retículo endoplásmico asociado a la mitocondria (MAM) con ASC y procaspasa 1, se induce la activación de caspasa 1 y la producción de IL-1b e IL-18. MAVS se localiza en la membrana externa mitocondrial, TRAF se transloca a la mitocondria e interactúa con ECSIT, contribuyendo a la producción de ROS. NLRX1 es internalizado a la matriz mitocondrial e interactúa con UQCRC2 una proteína del complejo III de la cadena de transporte de electrones, potenciando la producción de ROS. IRGM se une a un lípido mitocondrial, la cardiolipina, influenciando la autofagia, la fusión mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial y muerte celular. (Tomado de Arnoult *et al.*, 2011).

Una función indirecta de la participación de la mitocondria en la regulación de la respuesta inmune innata, es la producción de ROS, ya que modula varias vías de señalización incluyendo las vías de NF-K β , JNK y el inflammasoma caspasa 1 (Naik y Dixit, 2011). Las dos principales fuentes de ROS en la célula son la mitocondria y los complejos de oxidasa asociada a la membrana NADPH (NOX) y doblemente oxidada (DUOX). NOX2 y ROS son requeridos para una activación eficiente de MAVS durante la señalización antiviral (Soucy-Faulkner *et al.*, 2010), NOX2 es crucial en la expresión de MAVS porque sub-regula y disminuye la expresión de RNAm de MAVS afectando su localización mitocondrial. La dinámica mitocondrial, $\Delta\Psi_m$ y ROS son reguladores cruciales y/o efectores de esta vía (Kerr *et al.*, 1972; Rintahaka, *et al.*, 2008) (figura 12).

La señalización antiviral mediada por MAVS, es regulada no solo por la dinámica mitocondrial sino también por dos proteínas mitocondriales, NLRX1 (Moore *et al.*, 2008) y Gc1Qr (Xu *et al.*, 2009), involucradas ambas en la inhibición de RIG-I y MDA5. Se suma además que el $\Delta\Psi_m$ es crucial para esta vía (Koshida *et al.*, 2011). El rol preciso de la pérdida de $\Delta\Psi_m$ impide el rearrreglo del complejo MAVS y una fragmentación intensa de la red mitocondrial impidiendo la asociación con MAVS y su adaptador STING (Castanier *et al.*, 2010; Ishikawa y Barber, 2008), hay además inhibición de la síntesis de ATP, la principal función de la mitocondria (Tabla 3, Figura 13).

Tabla 3. Reguladores de la señalización antiviral mediada por MAVS

Componente	Localización	Observaciones	regula		Ref.
			+	-	
ATG5 ATG12, ATG16L1	Formación autofagosomas	TUFM y NLRX1 complejo organizado alrededor de MAVS, estimula autofagia	+		Fritz <i>et al.</i> , 2006
C1QBP	Pleiotrópico	Acumulación en mitocondria	+		Garedew, <i>et al.</i> , 2010
AZI2	Citoplasma	Involucrado en vía dependiente de MAVS (VSR)			Gunter <i>et al.</i> , 2004
ABL	Citoplasma, núcleo	Fosforila MAVS después de una infección viral			Gunter <i>et al.</i> , 2004
SRC	Citoplasma, núcleo	Interactúa con RIG y MAVS exacerbando la activación de IRF3	+		Gunter <i>et al.</i> , 2004
CYLD	Citoplasma	Regula negativamente la señalización de RLR por remoción de Lys63-unido a cadenas de ubiquitina		-	Desagher <i>et al.</i> , 2000 Gunter <i>et al.</i> , 2004
DDX3X	Citoplasma, Núcleo	Helicasa RNA promueve señalización de MAVS en infección	+		De Veer <i>et al.</i> , 1998 Ekert <i>et al.</i> , 2005
DHX58	Citoplasma	Helicasa RNA que inicia señalización de MAVS en infección	+		De Veer <i>et al.</i> , 1998 Ekert <i>et al.</i> , 2005



FADD	Citoplasma	Involucrado en el complejo TRADD y RPK1	+	Gunter <i>et al.</i> , 2004
IKK α , IKK β , IKK γ , IKK ϵ	Citoplasma, Núcleo	Regulador corriente arriba de la activación de TBK1	+	Ekert <i>et al.</i> , 2004 Gunter <i>et al.</i> , 2004
IRFs	Citoplasma, Núcleo	Dimerización por fosforilación de IKK ϵ y TBK1, entrada al núcleo y activa genes que codifican IFNs tipo I	+	De Veer <i>et al.</i> , 1998 Gunter <i>et al.</i> , 2004
ITCH	Citoplasma, Núcleo	Reclutado por PCBP; inicia la degradación de MAVS y proteosoma	-	Gunter <i>et al.</i> , 2004
MDA5	Citoplasma	Promueve la señalización de MAVS en infección	+	De Veer <i>et al.</i> , 1998 Ekert <i>et al.</i> , 2005
MFNs	Mitocondria	Unido a MAVS, divergencia funcional MFN1 MFN2	+	Goldstein <i>et al.</i> , 2011 Goodman <i>et al.</i> , 2010
NLRX1	Mitocondria	Regulador negativo de la interacción entre MAVS y RIG I	-	Goldstein <i>et al.</i> , 2011 Goodman <i>et al.</i> , 2010
PCBPs	Citoplasma	Recluta ITCH y media la ubiquitinación de MAVS y su degradación	-	Gunter <i>et al.</i> , 2004
PLK1	Citoplasma, Núcleo	Independiente de fosforilación, unión PLK1-MAVS desplaza TRAF3 inhibiendo producción de IFN	-	Gunter <i>et al.</i> , 2004
PSMA7	Citoplasma	Unión con MAVS induce degradación del proteosoma	-	Gunter <i>et al.</i> , 2004
RIG I	Citoplasma	Inicia la señalización de MAVS en infección	+	De Veer <i>et al.</i> , 1998 Ekert <i>et al.</i> , 2005 De Veer <i>et al.</i> , 1998
RIPK1	Citoplasma	Implicado en FADD y TRADD contenido en el complejo MAVS	+	Gunter <i>et al.</i> , 2004
RNFs	Mitocondria, MAMs	RNFs y RNF125 regula negativamente la señalización de RLR para activación de MAVS, RIG I y MDA5 para degradación	-	Gunter <i>et al.</i> , 2004
STING	MAMs	Unión con MAVS y reclutamiento de TBK1 durante la señalización por RIGI	+	Hornig <i>et al.</i> , 2002
TANK	Citoplasma	Regulador cadena arriba de IKK ϵ y activación de TBK1	+	Gunter <i>et al.</i> , 2004
TBK1	Citoplasma	Fosforilado, activa IRF3 e IRF7	+	Gunter <i>et al.</i> , 2004
TICAM1	Citoplasma	Interactúa con TANK, regulando directamente la activación de TBK1	+	Gunter <i>et al.</i> , 2004
TOM70	Mitocondria	Unión a MAVS durante infección viral, facilita el reclutamiento de TBK1 e IRF3	+	Ghayur <i>et al.</i> , 1997
TRADD	Citoplasma	Involucrado en FADD-RIPK1 contenido en el complejo MAVS	+	Gunter <i>et al.</i> , 2004
TRAFs	Citoplasma, Mitocondria	TRAF3 es un regulador cadena arriba de IKK ϵ y activación de TBK1. TRAF2 y TRAF6 puentea MAVS con NF- κ B	+	Doster <i>et al.</i> , 2008 Everett <i>et al.</i> , 1999
TUFM	Mitocondria	Conecta el componente MAVS con NRLX1 y la maquinaria de autofagia	+	Fritz <i>et al.</i> , 2006
VDAC1	Mitocondria	Inhibe MAVS, lo que resulta en efectos anti-apoptóticos	-	Ishikawa <i>et al.</i> , 2008
WDR5	Citoplasma	Esencial para el ensamblado del complejo MAVS	+	Gunter <i>et al.</i> , 2004

(Tomado y modificado de Galluzzi *et al.*, 2012).



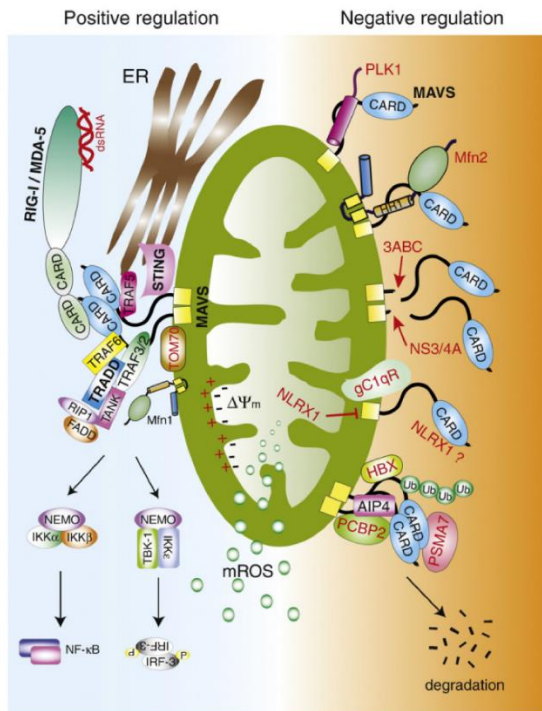


Figura 13. Reguladores positivos y negativos de la señalización vía MAVS. Las infecciones virales activan RLRs permitiendo la translocación de MAVS en la mitocondria por una interacción positiva (CARD-CARD). Estas asociaciones son permitidas por reclutamiento de varios efectores cadena abajo del ensamblado supramolecular, lo que permite activación de NF-Kb, IRF3 e IRF7. Las funciones de MAVS dependen de un potencial de membrana mitocondrial normal en mitocondrias sanas. Los ROS actúan como segundos mensajeros de la vía de señalización RLR, su incremento induce regulación positiva de la señalización MAVS. Por otro lado, MAVS se somete a control en un estado de reposo por varios reguladores negativos en un entorno no infectado, y se desacopla la respuesta despues de una infección viral (regulación negativa). (Tomado de Koshida *et al.*, 2013)

1.5.4. MITOCONDRIA Y APOPTOSIS

La mitocondria tiene un papel prominente en la regulación y la ejecución de distintas modalidades de muerte celular, incluyendo apoptosis intrínseca y extrínseca, además de regular la necrosis. Cuando el estímulo letal predomina la membrana mitocondrial se permeabiliza, lo que resulta no solo en la pérdida de la función del organelo sino en la activación dependiente de caspasa e independiente de caspasa como mecanismos efectores de muerte celular (Galluzi *et al.*, 2012) (Figura 14).

La muerte celular programada puede ser iniciada por una gran cantidad de inductores incluyendo ligandos de la familia TNF, radiación, inhibidores del ciclo celular o agentes infecciosos como virus. La apoptosis puede ser considerada una respuesta celular innata para limitar la propagación viral y la expresión de proteínas virales. Pero también puede facilitar la diseminación de virus al iniciar mecanismos pro-apoptóticos tempranos (Everett y McFadden, 1999).

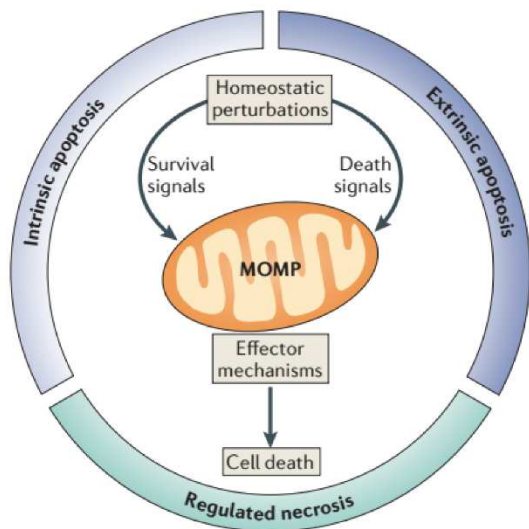


Figura 14. Control mitocondrial de la muerte celular. Perturbaciones en la homeostasis intracelular y las condiciones de estrés extracelular, resultan en activación de la transducción de dos cascadas, una de supervivencia y otra de muerte. (Tomado de Galluzi *et al.*, 2012).

La permeabilidad mitocondrial está relacionada con muerte celular y apoptosis; al ser un participante intrínseco de la apoptosis la mitocondria tiene un papel importante como mediador de muerte celular por mecanismos no apoptóticos y apoptóticos (Desagher y Martinou, 2000; Wang, 2001; Orrenius *et al.*, 2003; Saelens *et al.*, 2004; Ekert y Vaux, 2005). Cuando hay un estímulo de estrés existe un desbalance de muerte/supervivencia; varios cambios afectan la fisiología mitocondrial y su ultraestructura. Dependiendo de la persistencia del estímulo estas alteraciones pueden conducir a la célula a un punto de no retorno en la vía de la muerte celular (Rasola y Bernardi, 2007).

La apoptosis induce el factor AIF, endonucleasa G y un segundo activador de caspasa en mitocondria IAP. Los linfocitos T (CTLs) y las células NK (Natural Killer) destruyen los virus en células infectadas induciendo la secreción de citocinas como TNK, la liberación de perforinas y granzimas, o la activación de la proteína Fas en la célula diana (Everett y McFadden, 1999). Las proteínas celulares implicadas en el control de la apoptosis son dirigidas por mecanismos virales anti-apoptóticos (Turner, 1998; Everett y McFadden, 1999; Kalvakolanu, 1999; Tortorella, 2000).

La unión de TNF (citocina inflamatoria) con su receptor resulta en inicio de apoptosis o en necrosis programada. Muchos virus pueden tener mecanismos que inhiben la apoptosis prolongando así su vida en las células hospederas. Estas observaciones

establecen un rol fisiológico de los virus sobre la muerte celular y la necrosis programada (Aimee y Craig, 2004).

La piroptosis es una forma de muerte celular que ocurre con mayor frecuencia tras la infección con patógenos intracelulares y es probable que forme parte de la respuesta antimicrobiana. En este proceso, las células inmunes reconocen como señales de peligro a los organismos extraños, liberan citoquinas pro-inflamatorias, se hinchan, estallan y mueren. (Doster, 2008). El inflamasoma NLRP3, es una proteína implicada en la inducción de la caspasa 1 en respuesta a un amplio espectro de PAMPs y DAMPs (Naigai *et al.*, 2005). Es activado por señales celulares de peligro que inician la defensa por la respuesta inmune del hospedero, ayuda a la maduración de citocinas proinflamatorias como Interleucina IL-1 β . Una clave importante en el funcionamiento de NLRP3 es el adaptador ASC y caspasa 1. Detecta el estrés celular y recluta a ASC y procaspasa 1 resultando en activación de caspasa 1 y procesamiento de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18. Uno de los modelos propone que NLRP3 es activado por una vía común de ROS (Doster, 2008).

Una respuesta inflamatoria iniciada por el inflamasoma NLRP3 es desencadenado por infecciones y desregulación metabólica. La actividad de NLRP3 es negativamente regulada por autofagia y positivamente regulada por las especies reactivas de oxígeno (ROS). La mitofagia y autofagia bloquean la acumulación de daño, generación de ROS por la mitocondria y esto resulta en la activación del inflamasoma NLRP3 (Labbe y Saleh, 2008).

El resto del NLRP3 se localiza en estructuras del retículo endoplásmico en donde junto con su adaptador ASC se activa y se distribuye en el espacio perinuclear donde se pueden colocalizar con el retículo endoplásmico y los organelos mitocondriales. Ambos la generación de ROS y la activación de NLRP3 son suprimidos cuando la actividad mitocondrial es desregulada por inhibición de canales aniónicos voltaje-dependientes. Esto indica que NLRP3 sensa el daño y la disfunción mitocondrial de enfermedades inflamatorias causadas no solo por virus sino también bacterias (Zhou *et al.*, 2011).



1.6. INTERFERÓN

Los interferones (IFN) son citoquinas secretadas por las células que afectan a numerosos procesos son conocidos por sus propiedades antivirales y antiproliferativas. Existen tres tipos de IFN: IFN tipo I (IFN α / β) y III (IFN λ) se consideran los IFNs antivirales primarios, Aunque el tipo II (IFN γ) tiene efectos antivirales bien caracterizados. Los IFN son activados transcripcionalmente por eventos de señalización compuestos por sensores virales, proteínas adaptadoras, quinasas y factores de transcripción (figura 15). Los IFNs recién sintetizados son secretados por la célula infectada, se unen a sus receptores cognados, e inician la señalización a través de la vía JAK / STAT. El resultado es la inducción transcripcional de genes estimulados por interferón (ISGs) que codifican moléculas antivirales con el potencial de regular positiva o negativamente la señalización de IFN y otras respuestas del huésped (Schoggins, 2014) (figura 15).

Las citocinas juegan un papel importante en el inicio y regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, los virus han aprendido cómo bloquear su producción, actividad y transducción de señales. Las funciones de estas moléculas en el hospedero son diversas, los virus pueden neutralizar la actividad de las citocinas y sus homólogos redireccionando la respuesta inmune para su beneficio (Schoggins, 2014).

Los interferones reciben su nombre debido a su capacidad para interferir en la replicación de los virus en las células hospedadoras. Se unen a receptores en la superficie de las células infectadas, activando diferentes vías de señalización en las que participan diversas proteínas antivirales (como la PKR), para impedir la replicación de una amplia variedad de virus de ARN y ADN. Cumplen, además, otras funciones: activan células inmunes, como los macrófagos y las células NK; incrementan el reconocimiento de células cancerígenas o infecciones al dinamizar la presentación de antígenos a los linfocitos T y, finalmente, incrementan la capacidad de las células sanas para resistir a nuevas infecciones víricas (Rutter y Rizzuto, 2000).

Los IFNs poseen la habilidad de proteger las células de las infecciones virales. La actividad de IFN tipo I (α y β) y de IFN tipo II (γ) es ser parte de los mecanismos de defensa antiviral. Algunos virus bloquean la inducción de IFN responsable de la activación



de la señalización por la vía JAK (Janus Kinase) (Transductores y activadores de la transcripción) e inhiben la activación de vías efectoras de IFN induciendo un estado antiviral en la célula al limitar la replicación viral (Alcami y Ulrich, 2000). Esto culmina con la inhibición de la formación de la doble cadena de RNA dependiente de la activación de la proteína quinasa (PKR), fosforilación del factor 2 α de inicio de la traducción (Eif-2) y el sistema RNasa L, el cual degrada el RNA viral y arresta o interrumpe la traducción en las células hospederas (Schoggins, 2014).

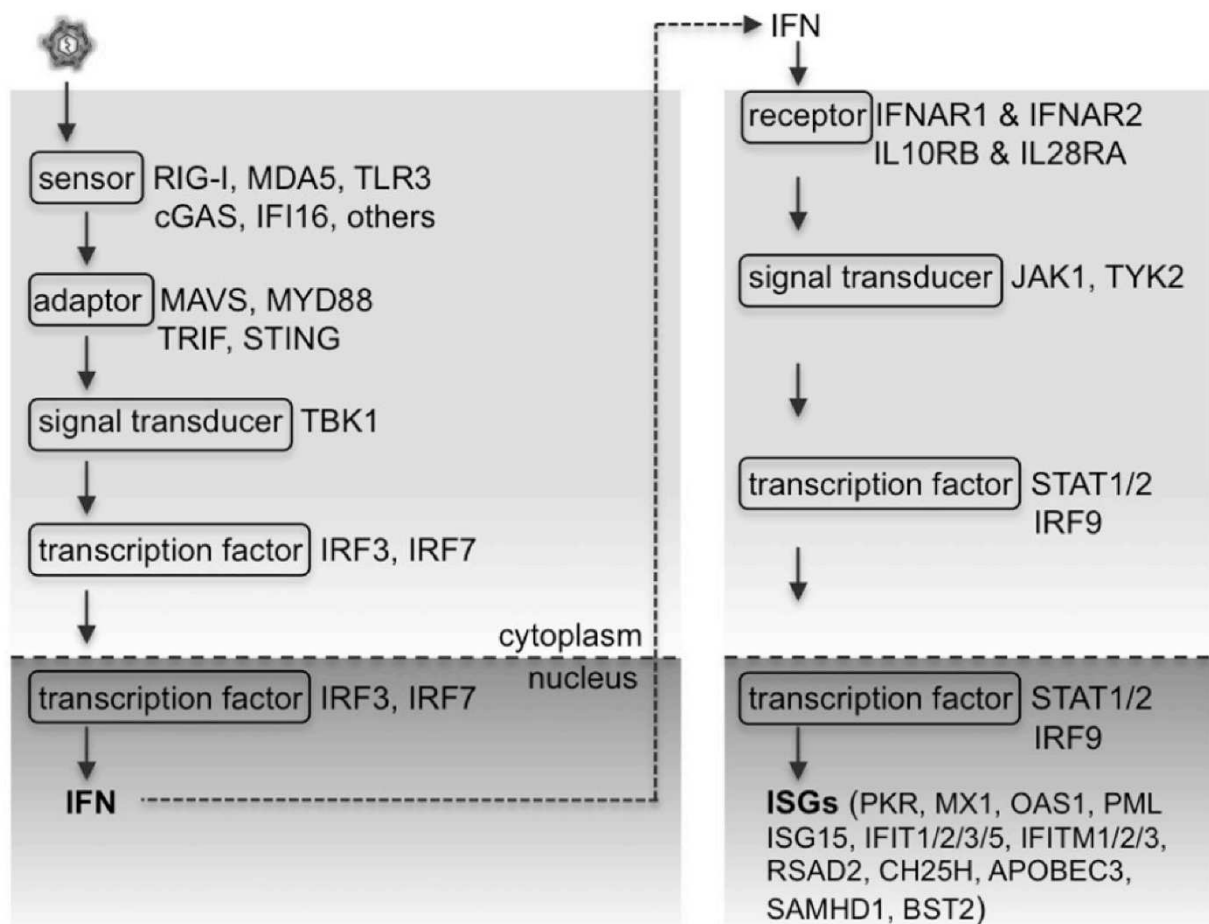


Figura 15. Revisión de la respuesta inmune innata ante una infección viral. Los genomas virales son detectados por sensores virales. Las proteínas adaptadoras inician una cascada de señalización que resulta en la activación de los factores de transcripción. IFN de tipo I / III son producidos y secretados de la célula infectada. Actúan sobre células vecinas a través de la JAK / STAT, lo que conduce a la inducción generalizada de ISG. (Tomado de Schoggins, 2014).

1.6.1 IFN - ISGs Y PATOGÉNESIS VIRAL

El Interferón (IFN) es un mediador importante de la respuesta inmune innata ya que provee una línea de defensa robusta ante la invasión por patógenos. Posterior a la detección de patógeno hay una subsecuente producción de IFN, éste puede ser secretado fuera de la célula y se puede unir a receptores de IFN en la superficie de las células iniciando la señalización vía JAK-STAT, que permite la regulación transcripcional de cientos de genes regulados por IFN (ISGs) (Schneider *et al.*, 2014).

El rol del IFN en la patogénesis viral está bien establecida en ratones y humanos. Ratones con defectos en la producción de IFN o ISG debido a eliminación de RIG-I, MDA5, cGAS, TLR3, MAVS, IRF1, IRF3 o IRF7 está ligado a la naturaleza de la infección viral. De manera similar en humanos con deficiencias desde nacimiento de STAT1, TYK2, NEMO, TBK1, TLR3, UNC93B1, TRIF y/o TRAF3 tienen respuestas defectuosas de IFN y son altamente susceptibles a uno o más enfermedades infecciosas. Las enfermedades producidas en Humanos y ratones debido a estas deficiencias genéticas están fuertemente implicadas con IFN, y por extensión con ISGs como genes primarios de control de la replicación y propagación de virus *in vivo* (Lamkanfi *et al.*, 2007; Schoggins, 2014).

Sin embargo, de los cientos de ISG conocidos, relativamente pocos están caracterizados *in vivo* y poco se sabe de sus contribuciones a las respuestas inmunes antivirales (tabla 4). Esto es probablemente debido a varias razones; en primer lugar, la amplitud de la respuesta de los ISG no se descubrió hasta el uso de la genómica transcripcional hace más de una década. En segundo lugar, hasta el momento solo existen pocas publicaciones recientes sobre ISGs. Tercero, los genes que controlan la producción de IFN (por ejemplo, RIG-1 / DDX58) o su señalización (por ejemplo, STAT 1) son objetivos de investigación más recientes (Nuesch y Rommelaere, 2007; Schoggins, 2014).



Tabla 4. Patogénesis viral en ratones deficientes de ISGs

ISG	Virus	Resultados patogénicos (letalidad, enfermedad)
<i>Eif2ak2 / Pkr, Oas1b, Rnase1</i> (mutante sencilla o doble)	EMCV, VSV, HSV-1, HSV-2, CVB4, MHV, VV, flavivirus SINV, retrovirus	Incremento No diferencia, subclínica
<i>Trim19/Pml</i>	LCMV, EMCV, SFV	Incremento
<i>lsg15</i>	CHIKV, MHV68, HSV-1, FLUAV, FLUBV, SINV, VV LCMV, VSV	Incremento No diferencia
<i>Zbtb16 / Plzf</i>	EMCV, SFV	Incremento
<i>Ifit1</i>	WNV, HCoV (carencia de actividad 2'-O- metiltransferasa)	Incremento
<i>Ifit2</i>	VSV, WNV, MHV-A59	Incremento
<i>Ifitm3 / Ifitm</i>	locus FLUAV, RSV	Incremento
<i>Rsad2 / viperin</i>	WNV, CHIKV FLUAV	Incremento No diferencia
<i>Ch25h</i>	MHV68	No diferencia, incremento replicación viral
<i>Apobec3</i>	MMLV, Friend retrovirus	Incremento
<i>Samhd1</i>	HIV-1-based vectors	No diferencia, Incremento transducción
<i>Bst2 / tetherin</i>	MMLV, MCMV, VSV	Mezclado, subclínico

Abreviaturas: CHIKV, chikungunya virus, CVB, coxsackie virus, EMCV encephalomyocarditis virus, FLUAV, influenza A virus, FLUBV, influenza B virus, HCoV, human coronavirus, HIV, human immunodeficiency virus, HSV, herpes simplex virus, LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus, MCMV, murine cytomegalovirus, MMLV, Moloney murine leukemia virus, RSV, respiratory syncytial virus, SFV, Semliki Forest virus, SINV, Sindbis virus, VSV, vesicular stomatitis virus, VV, vaccinia virus, WNV, West Nile virus. Tomado de Schoggins, 2014.

En los últimos años, el ritmo de descubrimiento de los mecanismos antivirales mediados por ISG ha aumentado. Mientras que los principales estudios en genes que modulan la producción IFN o la señalización se han dirigido a la delección de los ISGs en ratones. De los ISGs que han sido estudiados, la mayoría han sido fenotipos observables con respecto a la patogénesis viral (Schoggins, 2014) (tabla 4).

1.6.2. ACTIVACIÓN Y EXPRESIÓN DE ISGs

Los receptores de reconocimiento de patrones citosólicos (PRR) reconocen las cadenas virales de doble cadena (ds) o monocatenarias (ss) ADN o ARN. Los receptores AIM2 (ALRs), tales como IFI16, DAI o AIM2, se especializan en la detección de ADN, mientras que RIG-I y MDA5 (RLR) se especializan en detección de ARN y ADN. La GMP-AMP



sintetasa actúa como un sensor de ADN adicional. 2'-5'-Oligoadenilato sintetasa (OAS) detecta ARN extraño y produce ácido 2'-5' adenílico, que activa RNasa (RNaseL). Productos de degradación producidos por RNaseL estimulan RLRs (Li *et al.*, 1995).

Las señales son transducidas por el factor de transcripción estimulado por genes de IFN (STING) y (MAVS). La activación de STING / MAVS conduce a la fosforilación de los factores IRF3 e IRF7. Los dímeros fosforilados de IRF3 / 7 o NF-κB se translocan al núcleo, donde se unen y activan promotores específicos, desencadenando la expresión de IFN, así como un subconjunto de ISGs. Estos ISG incluyen IRF y PRR, pero también efectores antivirales tales como proteínas IFIT (Schneider *et al.*, 2014) (figura 16). Al inducirse la expresión de IFN a través de la vía JAK-STAT, se activa la expresión de un gran espectro de ISGs que se pueden dividir en efectores antivirales negativos o positivos que regulan la señalización por IFN. Un caso especial de reguladores positivos es IRF1, el cual se transloca directamente al núcleo para incrementar la expresión de un subconjunto de ISGs (Schneider *et al.*, 2014) (figura 16).

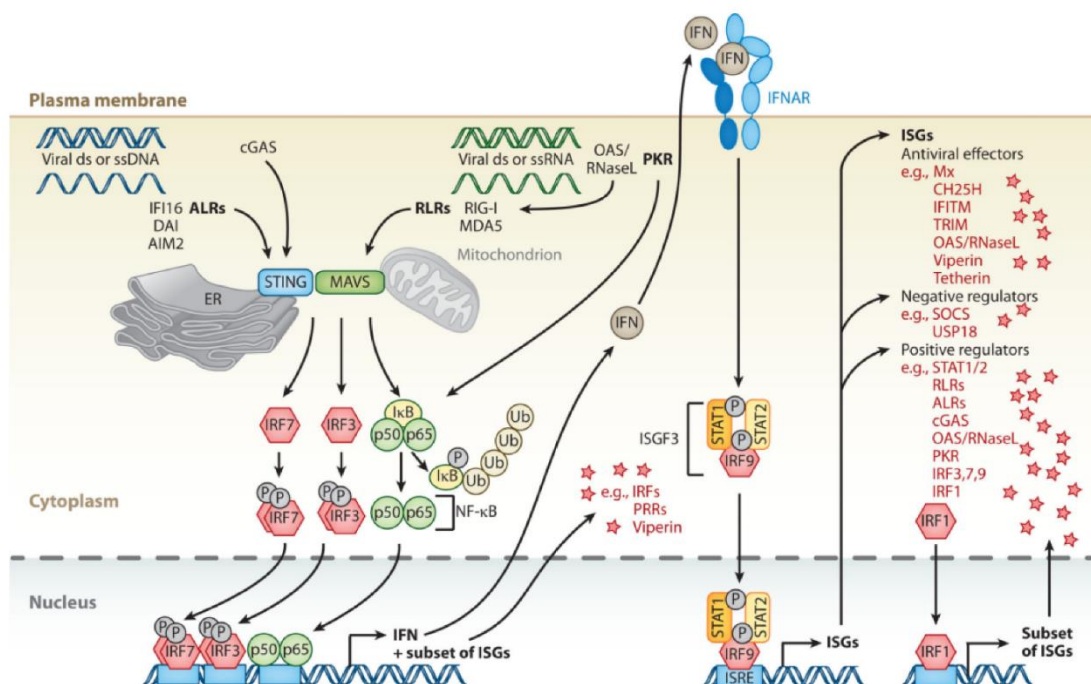


Figura 16. PRRs citosólicos y activación de ISGs. PRRs y muchos IRFs están presentes en las células en niveles basales, pero su expresión es mejorada por IFN. Tras la inducción, este conjunto de ISG actúa para reforzar la señalización de IFN y mejorar la detección de patógenos. Diversos ISGs se inducen directamente mediante la Vía que es independiente de la vía JAK-STAT, vía alternativa de ISG. Dicha inducción probablemente evolucionó para contrarrestar las estrategias de evasión de la respuesta inmune innata mediadas por patógenos. (Tomado de Schneider *et al.*, 2014).

1.7. PROTEINAS ANTIVIRALES IFIT

El control de las infecciones virales depende de una rápida detección del patógeno por la célula infectada y de la habilidad para montar una respuesta antiviral inmediata que impida la replicación viral y limite la diseminación de partículas virales a células vecinas. Durante los últimos años varios grupos de investigación han identificado la cascada de señalización encargada de inhibir y/o controlar las infecciones virales (Diamond y Farzan, 2012).

El estudio del control antiviral se ha centrado desde hace varios años en el descubrimiento y descripción de los mecanismos de acción de los ISGs (Interferon Stimulated Genes), ya que estos median las actividades del IFN en la evasión y control de varias familias de virus. Los genes estimulados por la secreción de IFN (ISGs) tienen dos actividades genética y funcionalmente distintas al inducir la producción de proteínas con repeticiones de tetratricopeptidos (IFIT) y la producción de proteínas transmembrana (IFITM). Los recientes avances se han focalizado en la identificación de los mecanismos de acción de los genes IFIT, buscando explicar su actividad ante la replicación, propagación y patogénesis de un amplio rango de infecciones virales (Werd, *et al.*, 2007; Diamond y Farzan, 2012).

Durante el proceso infeccioso viral las células del hospedero reconocen la invasión y desarrollan rápidamente una respuesta antiviral efectiva. En células de mamíferos ésta respuesta es iniciada inmediatamente después de la detección de (PAMPs), incluyendo ácidos nucleicos virales de cadena sencilla y cadena doble. Estos PAMPs detectan o son sensados por PRRs, que incluyen los receptores Toll (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9), receptores RIG-I (MDA5), Sensores de ADN (DAI, IFI16, DHX9 y DHX36) en endosoma y citoplasma (Bluyssen, 1994; Berchtold, 2008). La unión de PAMPs virales con PRRs desencadena la cascada de señalización que induce la expresión de genes de respuesta antiviral y citocinas proinflamatorias (IFN I), restringiendo con esto la replicación viral y modulando a su vez la inmunidad adaptativa (Desagher y Martinou, 2000) (Figura 16).



1.7.1. FAMILIA

Los genes IFIT codifican para una familia de proteínas que son inducidas por una infección viral mediante PAMPs-PRR e IFN. Los genes IFIT tienen una estructura genómica similar compuesta por 2 exones, han sido reportados en varias especies de mamíferos, aves, peces y anfibios. Se localizan en el citoplasma y carecen de actividad enzimática (Der *et al.*, 1998).

1.7.2. ESTRUCTURA

Contienen múltiples repeticiones de tetratricopeptidos (TPR); compuestas de alrededor de 34 aminoácidos acomodados en hélice que permite la interacción proteína-proteína. Adoptan una doble hélice-vuelta-hélice, los motivos TPR adyacentes usualmente forman una hoja de hélices antiparalelas que se curvan en una súper hélice, este pliegue único presenta superficies curvas cóncavas y convexas que permiten la unión de diversos ligandos (Wu *et al.*, 2014). Dichos dominios TPR regulan el ciclo celular, la transcripción, el transporte de proteínas y la unión entre proteínas. Los miembros de la familia IFIT tienen distintos números de TPR lo cual puede definir las diferentes funciones de cada miembro; IFIT 1 (6 TPR), IFIT 2 (4 TPR) e IFIT 3 (5 TPR). Las IFIT tienen carga positiva en el extremo C-Terminal, donde se lleva a cabo la unión con el genoma viral (Pichlmair *et al.*, 2011; Diamond y Farzan, 2012).

IFIT5 es un monómero, IFIT2 un dímero e IFIT1, IFIT2 e IFIT3 forman homodímeros en solución. La dimerización de IFIT2 ocurre mediante el intercambio de 3 hélices a través de 3 y 4 motivos TPR. IFIT2 parece tener preferencia por el RNA de doble cadena, pero no es claro en donde se establece la localización de la unión a RNA (Vladimer *et al.*, 2014).



1.7.3. EXPRESIÓN

En condiciones basales las células no expresan proteínas IFIT, con excepción de las células mieloides. Sin embargo, los genes IFIT inducen rápidamente un incremento en sus niveles después de una infección viral; estos patrones de expresión están determinados en parte por regiones promotoras en los genes IFIT que contienen elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE). IFIT 1 e IFIT 2 son inducidas con dos horas de tratamiento exógeno de IFN α (Sen y Sarkar, 2007), pero menos después de la exposición con IFN γ . En algunas células los niveles de RNAm de IFIT después de la estimulación con IFN pueden ser sostenidos o transitorios. Es decir, en algunas células hay subconjuntos de genes IFIT que se inducen selectivamente después de la estimulación por IFN tipo I o por una infección viral, puede entonces hablarse de una expresión diferencial de genes IFIT ante infecciones virales particulares (Sarkar y Sen, 2004). La expresión de genes IFIT también puede ser estimulada independientemente del IFN tipo I, al generarse señales posteriores a la unión de PRRs (TLR3, TLR4, MDA5 Y RIG-I) con los PAMPs (RNAdc y LPS). En este sentido los genes IFIT son descritos como genes inducibles ante el estrés viral. (Sarkar y Sen, 2004); y son inducidos directamente por IRF3, IRF1, IRF5 e IRF7 (figura 17).



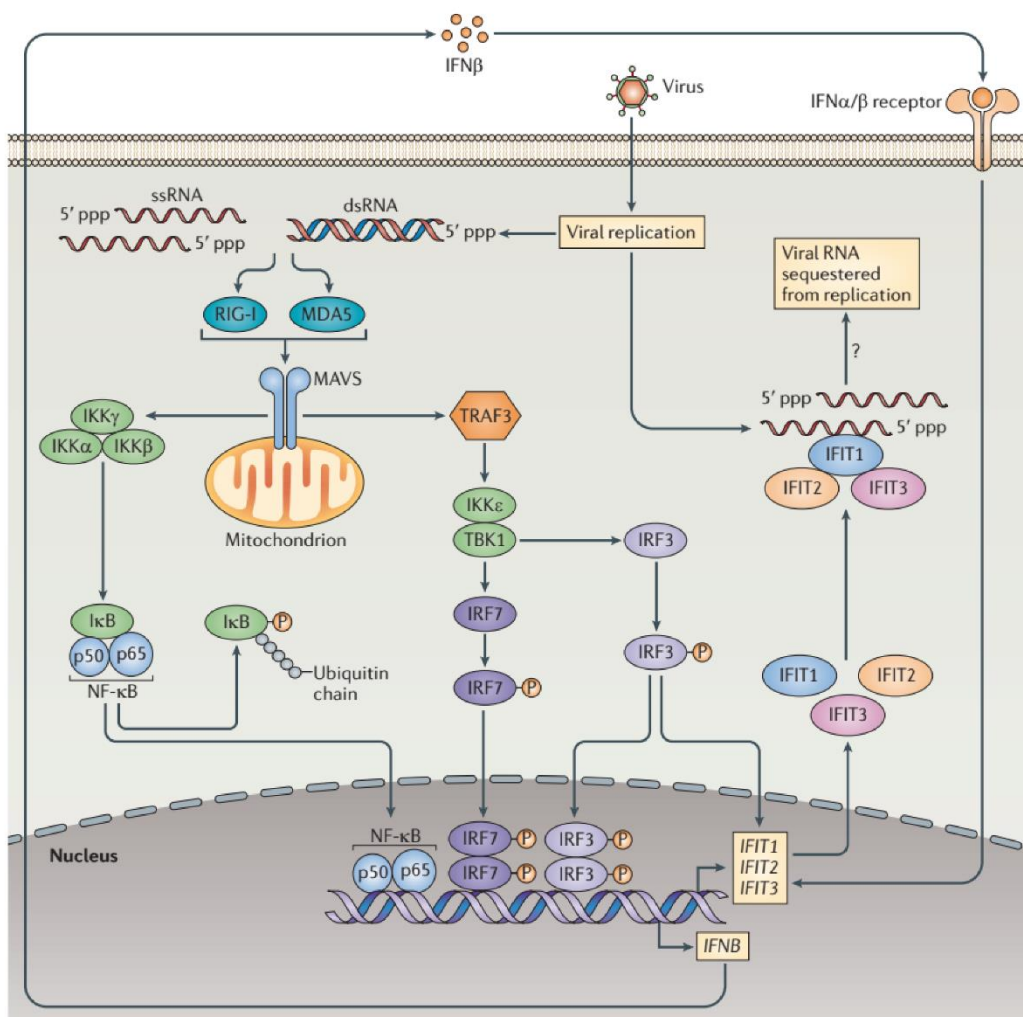


Figura 17. Proteínas IFIT expresión durante una infección viral. Los virus son reconocidos por sensores citoplasmáticos (RIG-I y MDA5). Se induce la expresión de genes estimulados con IFN (ISGs) incluyendo las proteínas IFIT (IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5), a través de las vías dependientes e independientes de interferón-β (IFNβ). IFIT1 funciona como un sensor de ARN viral que contiene el 5'-ppp resultando en el ensamblaje de un complejo IFIT1-IFIT2-IFIT3. Esto presumiblemente inhibe la infección viral por secuestro del genoma viral. (Tomado de Diamond y Farzan, 2013).

1.7.4. ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Las proteínas IFIT tienen un patrón de inducción rápido después de su activación mediada por IFN tipo I y por la unión PRRs-PAMPs, esto les confiere efectos inhibidores después de una infección viral. Se han reportado distintos mecanismos de acción de las proteínas IFIT mediante la inhibición de la replicación de diversos virus (Fensterl y Sen, 2011) (figura 17 y 18).

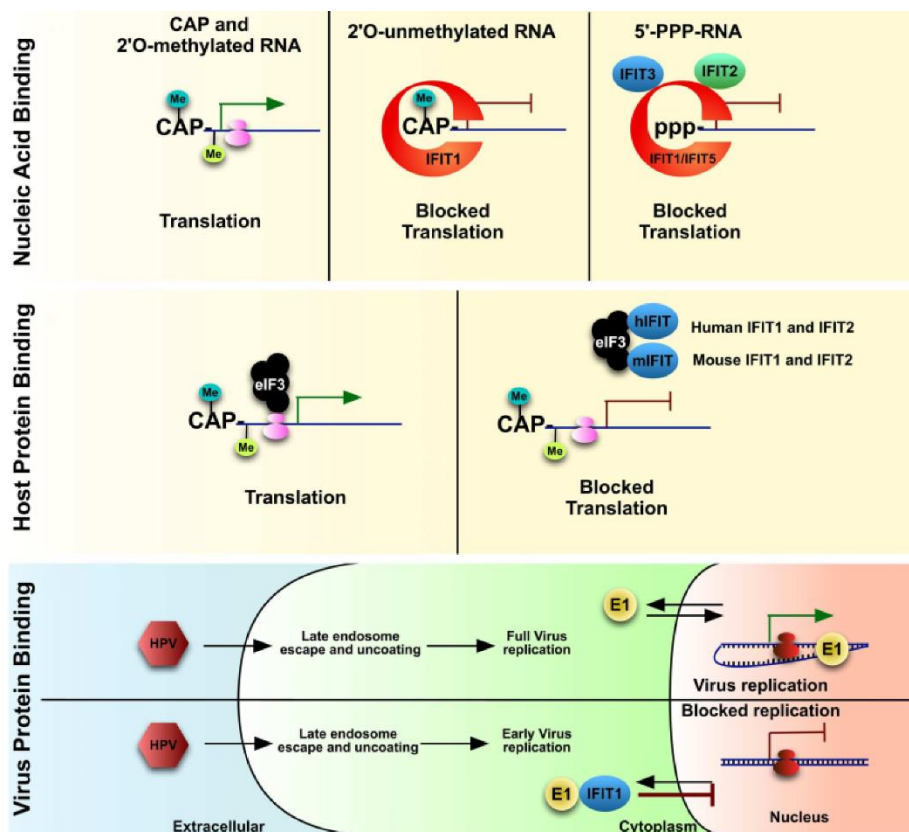


Figura 18. Regulación antiviral de las proteínas IFITs. IFIT1 se puede unir a: a) 5' o 2'-O sin metilar o 5'PPP-RNA (de ácido nucleico extraño). IFIT1, forma un complejo junto con IFIT2 e IFIT3, que puede bloquear la traducción de ácidos nucleicos. Se han descrito diversas IFIT que se unen a unidades proteicas del hospedero; b) eIF3, un componente clave de la traducción del mRNA puede unirse a IFIT1 y bloquear la traducción de toda la célula durante la infección viral. c) Además, IFIT1 puede unirse a un factor clave de virulencia del VPH, la Helicasa E1, y secuestrarlo en el citoplasma, previniendo así la replicación viral. (Tomado de Vladimer *et al.*, 2014).

1.7.4.1. Inhibición traducción celular.

El factor de iniciación en eucariotas (Eif3) (Figura 18) es un complejo proteico de múltiples subunidades que funciona en el inicio de la traducción, incluyendo el ensamblado del complejo IF2-GTP-Met-tRNA, la formación del complejo de preiniciación 43S, el reclutamiento del RNAm por el complejo de preinicio 43S y el escaneo del codón de inicio en el RNAm AUG. Estudios bioquímicos sugieren que algunos miembros de la familia IFIT reducen la eficiencia de la traducción de la proteína dependiente –cap por unión de las subunidades del complejo de inicio de la traducción Eif3; IFIT 1 e IFIT2 en el humano puede bloquear la unión de Eif3 con el complejo Eif2-GTP-Met-tRNA por interacción con Eif3; IFIT2 en el humano y el ratón junto con IFIT 1 pueden bloquear la formación del complejo de pre-iniciación 48S por su unión con Eif3 (Terenzi, 2008) (Figura 18 y 19).

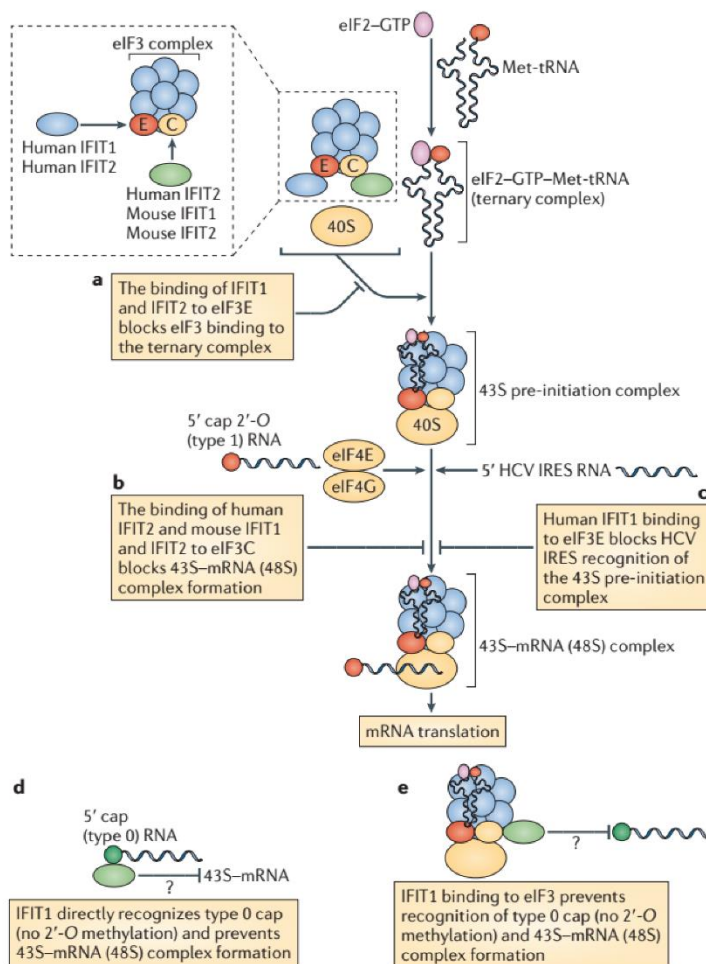


Figura 19. Diferentes mecanismos de control y modulación inmune de las proteínas IFIT durante la traducción del RNAm viral. **a)** IFIT1 e IFIT2 bloquean unión con complejo terciario Eif3; **b)** IFIT2/ifit1/ifit2 bloquean la formación del complejo 48S; **c)** IFIT1 se une a eif3 y bloquea el reconocimiento del complejo 43S; **d)** IFIT1 reconoce el cap 0 e impide la formación del complejo 43S. **e)** Reconoce cap 0 impidiendo la formación del complejo 48S. (Tomado de Pilchmair *et al.*, 2011)

Los miembros de la familia IFIT pueden detener la traducción de proteínas dependientes de cap- mediante la unión a subunidades del complejo de traducción, factor de iniciación eucariota 3 (eIF3). El complejo de proteínas eIF3 es necesario para el inicio de la traducción de varias maneras, incluyendo: el reclutamiento de mRNA. La IFIT1 del humano y la IFIT2 pueden bloquear la entrada de tRNA al eIF3; mientras que la IFIT2 del humano y el ratón IFIT1 y IFIT2 pueden bloquear el reclutamiento de mRNA. La disminución en la traducción de mRNA puede tener efectos perjudiciales en el hospedero (Vladimer *et al.*, 2014).

Los virus también pueden utilizar los sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) durante su replicación para la traducción independiente de cap, que también requiere eIF3. IFIT1 puede suprimir la traducción de ARN viral dependiente de IRES durante la hepatitis C (HCV). Los miembros de la familia IFIT pueden, además de los efectos sobre RNA y también afectan la traducción del virus directamente, alterando procesos de traducción (Vladimer *et al.*, 2014).

1.7.4.2. Unión a 2'-O

EL RNAm celular de eucariotas superiores y varios RNAs virales son metilados en la posición N-7 y 2-O del 5'cap guanosina por metiltransferasas nucleares y citoplasmáticas. La metilación en la posición N-7 es esencial para la traducción y estabilidad del RNA. Aun cuando no está totalmente claro como IFIT 1 inhibe los virus carentes de RNA metilado en la posición 2'-O previniendo el reconocimiento de RNA viral por el complejo de pre-iniciación 43S (Hinnebusch, 2006). IFIT1 tiene una afinidad mayor por 2'-O -sin metilar resultando en inhibición de la traducción, y un decremento en la infección viral (Vladimer *et al.*, 2014) (figura 18).

1.7.4.3. Unión RNA 5'PPP

Los virus pueden formar una cadena larga de RNA y/o generar RNA trifosfatado (PPP-RNA) durante su ciclo de vida. Recientemente se describió que IFIT 1 del humano también puede tener una función de sensor de genoma viral mediante reconocimiento del



extremo libre 5'-PPP, secuestrándolo del sitio de replicación bloqueando el inicio de la traducción (Figura 14). Con el uso de proteómica con RNA 5'-PPP como cebador y análisis por espectrometría de masas se identificó a IFIT1 como un elemento de unión primario a este sitio. Entonces IFIT 1 interactúa directamente con RNA 5'-PPP, al mismo tiempo IFIT2 e IFIT3 forman un complejo con IFIT 1 el cual es requerido para dicha función. Para aclarar más el papel de los genes de la familia IFIT se requieren estudios adicionales con virus ARN y ADN y en células deficientes IFIT para garantizar y establecer el mecanismo de control de diferentes familias de virus por los genes IFIT (Pichlmair *et al.*, 2011) (Figura 18).

1.7.4.4. Unión a proteínas virales

Si bien el mecanismo IFIT es principalmente de control antiviral. Dicha actividad se dirige a través de la unión con el ácido nucleico extraño. Así IFIT 1 puede inhibir la infección del Papilomavirus humano (HPV), un virus ADN de cadena larga, mediante un mecanismo distinto por unión con la helicasa viral E1, el cual es necesario para la replicación. E1 es una proteína viral multifuncional con actividad de ATPasa y ADN helicasa. IFIT 1 secuestra el HPV E1 en el citoplasma, quitándolo del complejo de replicación localizado en el núcleo. La replicación de HPV es sensible a los efectos antivirales del IFN tipo I, silenciando IFIT 1 con RNAs resulta en pérdida de esta actividad inhibitoria. En una mutante E1, en el cual se eliminó la unión con IFIT 1, se continúa con la replicación de ADN de HPV incluso en la presencia de niveles inhibitorios de IFN tipo 1 (Sen y Sarkar, 2007) (figura 18).

1.7.5. Modulación de la respuesta inmune innata

Además de sus efectos antivirales las proteínas IFIT poseen actividad inmunomoduladora, aunque los datos aun no son muy consistentes. Dos informes sugieren que las proteínas IFIT regulan negativamente la actividad inflamatoria del hospedero y su respuesta antiviral. Uno muestra que la expresión ectópica de Ifit 2 en macrófagos de ratones inhiben la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF) inducida mediante LPS,



interleucina 6 y CXCL2 (MIP2) y este efecto es mediado post-transcripcionalmente, posiblemente por la afectación de la estabilidad de RNAm (Liu *et al.*, 2011). Recientemente se reportó que IFIT 1 e IFIT 2 en humano se unen e inhiben a los estimuladores del gen de IFN (STING o MITA), con funciones de proteína adaptadora mitocondrial que recluta TBK1 (regulador de inflamación) e IRF3 para formar un complejo con MAVS (Adaptador de señalización mitocondrial), resultando en una inducción de IFN β en respuesta a ARN o ADN viral (Diamond y Farzan, 2012).

El silenciamiento de IFIT 1 inhibe la infección por VSV (virus de la Estomatitis Vesicular) presumiblemente por modulación de respuestas dependiente de IRF3 e IFN. Análisis bioquímico indica que IFIT 1 interrumpe la interacción física entre STING y MAVS o TBK1 (Li, 2007). Un TPR de IFIT 3 interactúa con la porción N-terminal de TBK1 y puentea esta con MAVS sobre la mitocondria, de modo que las respuestas antivirales del hospedero son impulsadas en presencia de IFIT 3 (Lee y Kim, 2007). Ante este panorama es imprescindible la realización de más investigaciones donde se evalúe la red y los diversos efectos inmuno-moduladores de los genes de IFIT.

IFN tiene habilidad para unir componentes del complejo IRF3 e inhibir su traducción en el hospedero; las proteínas IFIT contribuyen con la restricción de la división celular debido a la señalización por IFN. Independientemente las proteínas IFIT pueden regular la expresión de reguladores negativos del ciclo celular, resultando en la acumulación de células en la transición de las fases G1/S (Lin y Wu, 2010).

IFIT 1 muestra unión y secuestro de la proteína ribosomal L15 (RPL15). La expresión ectópica de IFIT 1 o el silenciamiento de RPL15 tienen efectos anti-proliferativos en células de cáncer gástrico de humano con altos niveles de IFIT 1 correlacionado con inhibición de la proliferación por inducción del IFN. Finalmente, la expresión en humano de IFIT 2, independiente de la estimulación por IFN muestra que promueve apoptosis celular vía señalización por mitocondria; IFIT 2 forma un complejo con IFIT 1 e IFIT 3 regulando negativamente la apoptosis (Lovleen *et al.*, 2013). Al parecer las proteínas IFIT como un complejo regulan la apoptosis celular después de la inducción por IFN tipo I y algunas otras vías de estrés celular (Diamond y Farzan, 2012).



IFIT3 interactúa con TBK1 (TNFR-Factor asociado a NF-kB activador de unión a la quinasa 1), una quinasa que modula la respuesta inmune innata. Esta interacción de IFIT3 con TBK1 por puentes tiene señalización anti-viral mitocondrial vía MAVS directamente en las mitocondrias; Sobre-expresión o subexpresión de IFIT3 dio lugar al aumento o disminución de la expresión génica antiviral, respectivamente (Vladimer *et al.*, 2014).

IFIT1 e IFIT2 se propone interactúan con genes estimulados por IFN (STING), que recluta TBK1 (descrito anteriormente para unirse a IFIT3) y propaga la fosforilación del factor de transcripción IRF3 (Factor de transcripción regulador de IFN 3), activación de NF-kB, e IFN junto con MAVS. En este caso, la sobreexpresión de IFIT1 en células HEK dio lugar a una disminución de la activación de IRF3 y la activación de IFN β . IFIT1 interrumpe la interacción de STING con MAVS o TBK1 (Liu *et al.*, 2011).

Dados los resultados obtenidos en la propagación de la vía y en los efectos inmunológicos se necesita más trabajo de investigación de las proteínas IFIT a nivel individual como en conjunto, tanto *in vitro* como *in vivo*, para tener una visión amplia de los mecanismos involucrados durante una infección viral. Además, se debe caracterizar los complejos proteicos formados por los miembros de la familia IFIT.



Capítulo II

2.1. HIPÓTESIS

La asociación temprana del virión de PVC con la mitocondria afecta la producción de IFN β y en consecuencia la expresión de las proteínas IFIT1 e IFIT3.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo General:

Establecer la sub-expresión de IFN β , IFIT1 e IFIT3 en células MDCK infectadas con Parvovirus Canino como modelo de un mecanismo viral de evasión de la respuesta inmune.

2.2.2. Objetivos Particulares:

- Construir una curva de replicación del PVC, para establecer una fase temprana y tardía de la infección viral.
- Evaluar la expresión de las IFN β , IFIT1 e IFIT3, en fases temprana y tardía de la infección viral.



Capítulo III

MATERIAL Y METODOS

3.1. Lugar de Trabajo

Todos los procedimientos experimentales se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria perteneciente al Departamento de Producción Agrícola y Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

3.2. Cepa *wt* Parvovirus canino

La cepa de virus utilizada fue purificada a partir de heces de perro de muestras remitidas por el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Nacional Autónoma de México para el diagnóstico de Parvovirus canino (PVC), al Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

3.3. Plásmido PVCMAN

3.3.1. Cultivo

Como control positivo de PVC se utilizó un plásmido con un fragmento clonado de 1446 pb de la proteína VP2. Para su cultivo se sembró PVCMAN en agar LB (Luria Bertani) con ampicilina, 1 μ L (1000 mg/2 mL), se incubó 24 horas a 37°C; Posteriormente, se tomó una colonia y se sembró en un matraz de 250 mL estéril, donde previamente se colocarán 50 mL de medio LB y ampicilina 1 μ L. Dicho matraz se puso en agitación y se incubó por 18 horas a 37°C.

3.3.2. Extracción ADN plásmido

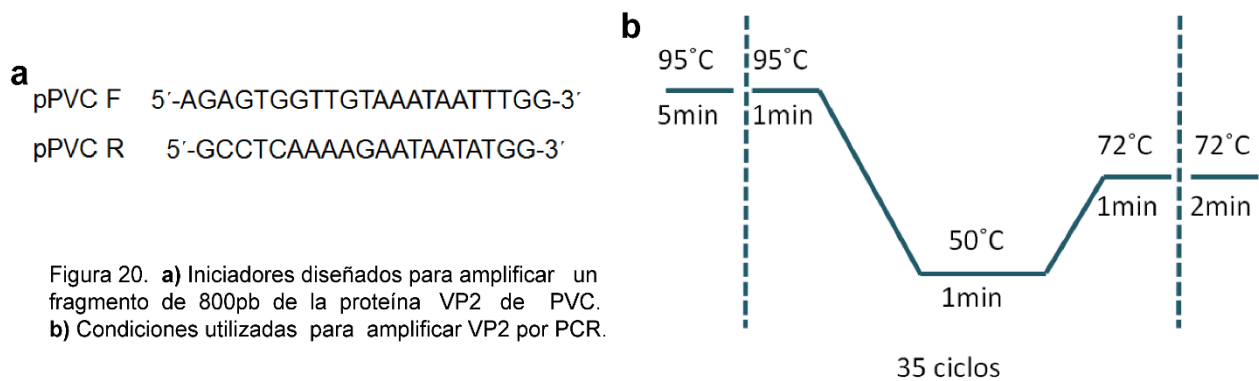
Se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el protocolo de Lisis Alcalina (protocolo modificado de Birnboim-Doly, 1979 e Ish Horowicz-Burke, 1981) anexo 1. La pastilla de ADN obtenida se resuspendió en 20 μ L de TE (TRIS 10 nM, EDTA 1 mM



pH 8). Se verificó la calidad de la extracción mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, que fue teñido con bromuro de etidio para su observación en un transiluminador (BIO-RAD Universal Hood II ®).

3.3.3. PCR proteína VP2 de PVCMAN

Del ADN de PVCMAN a continuación, se realizó PCR para amplificar un fragmento de 800 pb de la proteína VP2. En un tubo estéril de PCR de 0.2 mL, se agregaron 25 µL de PCR Master Mix 2X, 1 µL del iniciador pPVCF (10 µM), 1 µL del iniciador pPVCR (10 µM), 2 µL de ADN plasmídico (100 ng/µL) y 21 µL de agua libre de nucleasas. La secuencia de iniciadores utilizados y las condiciones bajo las cuales fueron amplificados por PCR se muestran en la figura 20 (desnaturalización 1 min a 95°C, alineación 1 min a 50°C y elongación 1 min a 72°C por 35 ciclos) (Termo MJ mini BIORAD ®) (Figura 20).



3.3.4. Copias genómicas VP2 por q-PCR

Para cuantificar el número de copias genómicas de PVC y construir una curva patrón de concentraciones conocidas de ADN de PVCMAN, se realizó un q-PCR empleando el ADN plasmídico. Del producto amplificado por PCR (800 pb), se purificó con silica/isotiocianato de guanidina (protocolo modificado de Clewley, 1993) anexo 2.

Para corroborar purificación de ADN se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio que se visualizó en un transiluminador (BIO-RAD Universal Hood II ®). Ya purificado el ADN de PVCMAN se cuantificó la concentración de ADN contenida en el tubo mediante espectrofotometría a 280 nm y se hicieron diluciones de 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng y 0.001 ng.

En tubos de PCR de 0.2 mL se colocaron 12.5µL de Maxima SYBR Green/qPCR Master Mix 2X, 1µL del iniciador pPVC F, 1 µL del iniciador pPVC R, 9.5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN de cada una de las diluciones (1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng y 0.001 ng). Esta reacción se metió en un equipo de q-PCR (Rotor-Gene Q Qiagen®) bajo las condiciones presentadas en la figura 21.

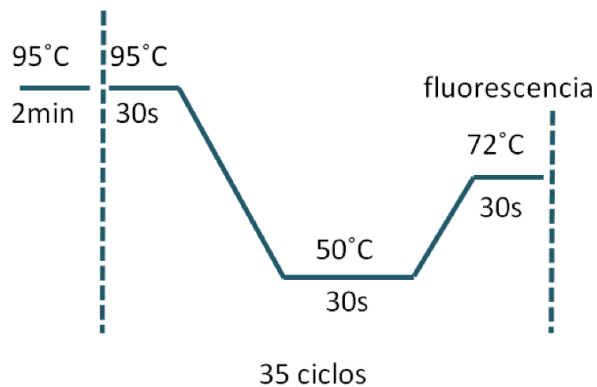


Figura 21. Condiciones utilizadas en el q-PCR para cuantificar el número de copias genómicas de PVC en diferentes concentraciones de ADN de PVCMAN, para construir una curva patrón de concentraciones virales.

El Rotor-Gene Q cuenta con un software donde se realizó el análisis de las CTs obtenidas; Se dan los valores de las CT alcanzadas por cada una de las muestras analizadas, esta CT se estimó estadísticamente en unidades de concentración en ng/µL por muestra; teniendo esta concentración se calculó el número de copias de plásmido PVCMAN presentes; se determina el número de copias del templado usando la calculadora de URI Genomics & Sequencing Center. Los datos que se solicitan de entrada son: concentración de ADN en ng y longitud total del templado de PVCMAN (5300 pb). Teniendo cuantificadas concentraciones conocidas de PVCMAN, fue posible cuantificar muestras de los diferentes ensayos de infección que se realizaron, permitiendo así tener el número de copias genómicas de PVC a lo largo de un periodo de infección viral.

3.4. Células MDCK

3.4.1. Cultivo

Para hacer las infecciones de CPV *in vitro* se utilizarán células MDCK (Madin-Darby canine kidney). Los viales de células guardados en congelación a -72°C fueron

descongelados; las células fueron colocadas en tubos cónicos de 15 mL estériles con 5 mL de MEM (Minimum Essential Medium, Gibco®) con SFB (Suero Fetal Bovino) 10%, para limpiar los restos del SFB y DMSO; se centrifugó el tubo a 800 rpm por 5 minutos y se retiró sobrenadante; se adicionó 1 mL de MEM fresco homogeneizando suavemente la pastilla celular para colocarla finalmente en botellas de cultivo celular (tissue culture flask, Jet Biofil®) de 25 mL (12.5 cm²), 50 mL (25 cm²) y/o 250 mL (50 cm²) según fuera el caso; se adicionó además MEM fresco con SFB 10% (3 mL, 5 mL o 10 mL), HEPES 1 M (regulador pH) y A/A (ampicilina G, estreptomicina y anfotericina B, Hyclone®). Las células se cultivaron de 1 a 5 días a 37°C, hasta su uso.

3.4.2. Cuantificación células MDCK

Las células MDCK se utilizaron en los ensayos de infección con PVC, como modelo de infección viral. Las células crecidas previamente en cultivo celular que presenten una monocapa con una confluencia del 80-90% fueron desprendidas con 8 mL de Tripsina (0.05 M) filtrada y estéril, las células desprendidas junto con la tripsina se colocaron en un tubo cónico de 15 mL estéril, se agregaron 5 mL de MEM con SFB 10% y se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos; posteriormente, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de MEM con 10% SFB.

Para el conteo celular se tomaron 50 µL de las células desprendidas y se colocaron en un tubo de 0.5 mL estéril; se agregaron 50 µL del colorante Azul de Trypan al 0.4% (Sigma®) y se homogeneizó el tubo y se dejó reposar durante 8 minutos; Pasado el tiempo se procedió a estimar el número de células por 1 mL de medio, mediante el uso de un hemocitómetro (0.100 MM) el cual se observó en un microscopio de objetivos invertidos (Velab^{MR}). Se realizó el conteo de las células viables (no teñidas de azul) de los 4 cuadrantes del hemocitómetro; se calculó un promedio y éste se multiplicó por el factor de dilución y finalmente se expresó en 1x10⁴ células/mL (Ecuación 1). Se utilizaron de 100 000 a 500 000 células por botella o por pozo a infectar.

Ecuación 1

$$\text{céls/mL} = \text{promedio}(4 \text{ cuadrantes}) \times \text{Factor de dilución} (2) \times 10^4$$



3.5. Cultivo PVC *in vitro*

En un tubo cónico de 15 mL estéril se colocaron 3 mL de MEM con 10% SFB, 100 000 células MDCK previamente cuantificadas con el hemocitómetro y 200-400 μ L del inoculo viral de la cepa de PVC descrito anteriormente. El tubo se puso en incubación a 37°C por 2 horas, para permitir el contacto directo del virus con las células.

Pasadas las 2 horas el inoculo contenido en el tubo cónico se sembró en una botella de 25 mL (12.5 cm²), 50 mL (25 cm²) y/o 250 mL (50 cm²), se adicionaron 2-8 mL de MEM con 10% SFB, 25 μ L-100 μ L de HEPES 1 M y 50 μ L-200 μ L de A/A. Las botellas se mantuvieron en incubación a 37°C de 1 a 5 días. Pasado el tiempo de infección viral se retiró el sobrenadante y se colocó en un tubo cónico de 15 mL estéril y se guardó en congelación a -4°C hasta su siguiente uso. Se realizaron pases de infección para aumentar la virulencia de la cepa. Posteriormente se hizo la extracción de ADN y se amplificó por PCR (figura 20) (verificar amplificado de 800 pb) y q-PCR (figura 21) para cuantificar el número de copias genómicas de PVC, estos inóculos virales cuantificados fueron utilizados para los posteriores ensayos de infección.

3.6. Curva de replicación PVC

Para construir una curva de replicación viral se hicieron ensayos de infección de células MDCK con PVC de 1 a 15 días para ver el comportamiento del número de copias genómicas de PVC a lo largo del período de infección y con esto establecer una fase temprana y una fase tardía de infección viral.

3.6.1. Ensayo de infección *in vitro* (Placa 6 pozos)

En un tubo cónico de 15 mL estéril se colocaron 6 mL de MEM con 10% SFB, 600 000 células MDCK (100 000 células/mL) y 1×10^6 partículas virales de PVC cuantificadas previamente por q-PCR (MOI 100:1), el tubo se incubó a 37°C durante 2 horas.

Posteriormente, se homogeneizó el contenido del tubo de 15 mL (células ya infectadas) y en una placa de cultivo de 6 pozos (Corning costar®), se colocó en cada pozo 1 mL del



inoculo, se agregará además a cada pozo 1 mL de MEM con 10% SFB, 25 µL de HEPES 1 M y 50 µL de A/A; la placa se dejó en incubación de 1 a 14 días.

La infección viral se detuvo a diferentes días (cada 72 horas). Se retiró el sobrenadante de cada pozo (a los días 1, 3, 5, 8, 11 y 14) y se guardó en tubos estériles de 1.5 mL. Las células que queden adheridas aún en el fondo de cada pozo se desprenderán con 500 µL de Solución de Lisis Total (5 M isotiocianato de guanidina, 100 mM TRIS/HCL pH 6.4, 50 mM EDTA pH 8, y 2.5% TRITON 100X), se recuperaron estos 500 µL en un tubo estéril de 1.5 mL. Los tubos que contengan el sobrenadante y las células que se desprendieron con SLT se guardarán a -4°C para su posterior extracción de ADN y cuantificación de copias genómicas por q-PCR.

3.6.2. Ensayo de infección *in vitro* (Placa 48 pozos)

Una vez estandarizadas las condiciones básicas en un ensayo de infección se establecieron los días en que se detuvo la infección; se procedió entonces a realizar ensayos de infección *in vitro* en placas de 48 pozos. Con los tratamientos enumerados en la tabla 5, figura 22. La infección se detuvo a los días 1, 3, 5, 8, 11 y 14.

Tabla 5. Tratamientos en cada ensayo de infección por PVC.

Tratamiento	Observaciones
I	Células MDCK sin infectar
II	Células MDCK tratadas con IFN exógeno
III	Células MDCK tratadas con IFN exógeno infectadas con PVC
IV	Células MDCK infectadas con PVC

3.6.2.1. Control (Células MDCK sin infectar).

En un tubo estéril cónico de 15 mL se colocaron 800 000 células MDCK (100 000 cels/mL), 8 mL de MEM con SFB 10%. Se incubó a 37°C durante 2 horas. En una placa de cultivo de 48 pozos se colocó en cada pozo 1 mL del inóculo celular (8 pozos).



3.6.2.2. Células MDCK tratadas con IFN exógeno.

En un tubo estéril cónico de 15 mL se colocaron 800 000 células MDCK (100 000 cels/mL), 8 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES. Se sembró 1 mL del inóculo celular por pozo y se incubó por 24 hrs hasta que la monocapa estuviera a alrededor de 80%.

24 horas después se adicionó IFN (VIRBAGEN OMEGA Interferón Omega) a una dosis de 10 000 U/μL. Se incubó a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de cada pozo y la monocapa se lavó con 1 mL de PBS; se agregaron de nuevo 1 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES a cada pozo; la placa se incubó a 37°C (1, 3, 5, 8, 11 y 14 días).

3.6.2.3. Células MDCK tratadas con IFN exógeno infectadas con PVC.

En 2 tubos estériles de 15 mL se colocaron 800 000 células MDCK (100 000 cels/mL), 8 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES. Se sembró 1 mL del inóculo celular por pozo y se incubó por 24 hrs hasta que la monocapa estuviera a alrededor de 80%.

24 horas después se adicionó IFN (VIRBAGEN OMEGA Interferón Omega) a una dosis de 100 000 U/μL. Se incubó a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de cada pozo y la monocapa se lavó con 1 mL de PBS; se agregaron 1×10^6 partículas virales de PVC (MOI 100:1) además de 1 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES a cada pozo; la placa se incubó a 37°C (1, 3, 5, 8, 11 y 14 días).

3.6.2.4. Células MDCK infectadas con PVC.

En 2 tubos estériles de 15 mL se colocaron 800 000 células MDCK (100 000 cels/mL), 8 mL de MEM con SFB 10% y 1×10^6 partículas virales de PVC (MOI 100:1). Se incubaron a 37°C durante 2 horas. En una placa de cultivo de 48 pozos se colocó en cada pozo 1 mL del inóculo, A/A y HEPES. Se incubó la placa por 1, 3, 5, 8, 11 y 14 días.

El ensayo de infección se detuvo a diferentes días (cada 72 horas) como se muestra en la figura 22. Se retiró el sobrenadante de cada pozo (a los días 1, 3, 5, 8, 11 y 14) y este se guardó en tubos estériles de 1.5 mL. Las células que quedaron adheridas aún en el fondo de cada pozo se desprendieron con 500 μL de Solución de Lisis Total (5 M isotiocianato de guanidina, 100 mM TRIS/HCL pH 6.4, 50 mM EDTA pH 8, y 2.5% TRITON 100X), se recuperaron los 500 μL en un tubo estéril de 1.5 mL y se guardaron a



-4°C para su posterior extracción de ADN y cuantificación de copias genómicas por q-PCR.

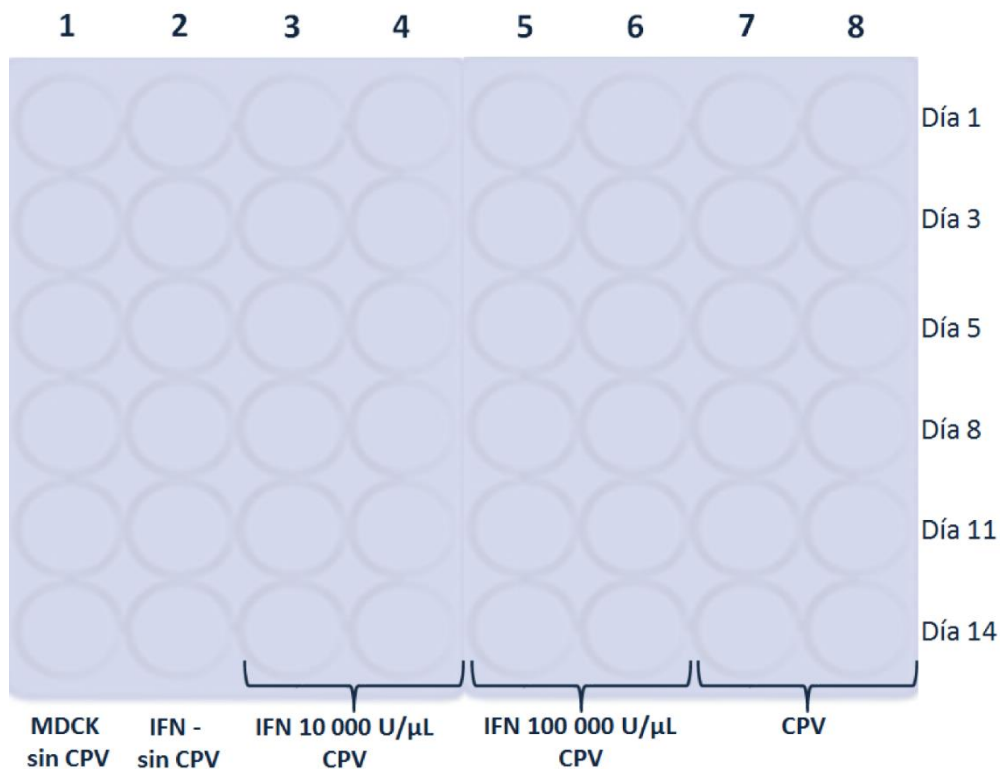


Figura 22. Placa de 48 pozos, se muestra arreglo factorial de los ensayos de infección. Se utilizaron 8 pozos por tratamiento. Se realizaron 3 ensayos, con esta disposición por tratamiento.

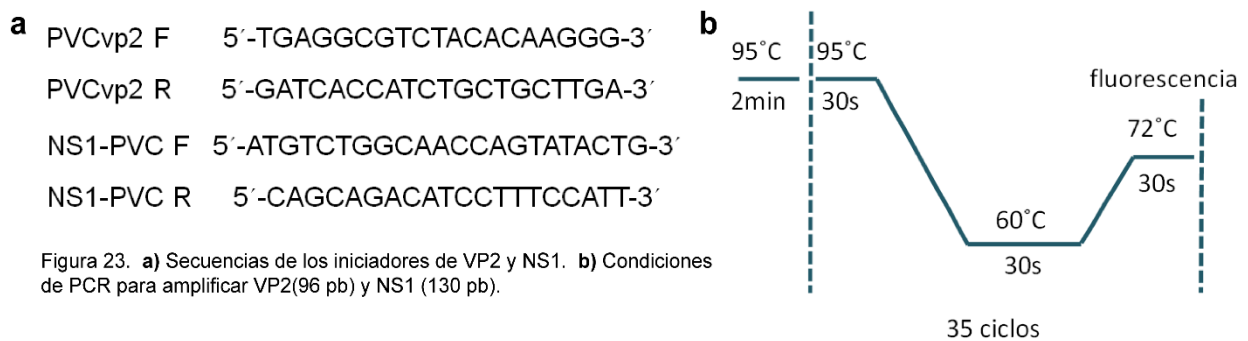
3.6.3. Extracción ADN

Se hizo extracción de ADN (para cuantificar el número de copias genómicas virales de PVC) por un lado de los ensayos de infección que se realizaron para la construcción de la curva de replicación viral y por el otro de los ensayos de infección de la fase temprana y tardía. Ya sea de sobrenadante o de la monocapa se hizo la extracción de ADN con silica/isotiocianato de guanidina (protocolo modificado de Clewley, 1993) anexo 3.

La pastilla obtenida se resuspendió en 15-20 μL de TE (TRIS 10 nM, EDTA 1 mM pH 8). Se verificó la calidad de la extracción mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador (BIO-RAD Universal Hood II ®).

3.6.4. DISEÑO INICIADORES para PCR y qPCR

Además de los iniciadores ya descritos en la figura 20; para la proteína no estructural VP2 de PVC, se diseñaron iniciadores para NS1 (figura 23). Los iniciadores se diseñaron a partir de secuencias reportadas de cánidos y carnívoros terrestres en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias en el programa DNAMAN (Lynnon Biosoft, 2015), y se diseñaron un par de iniciadores para la proteína de interés.



3.6.5. PCR y q-PCR copias genómicas NS1

Del ADN extraído por las técnicas y protocolos ya descritos anteriormente, se cuantificó mediante espectrofotometría (280 nm) para tener al menos 100 ng/ μ L por muestra. Se realizó primero un PCR con las condiciones mostradas en la figura 23 para verificar que solo se amplificó un producto por par de iniciadores utilizados. De este producto cuantificado se realizaron diluciones (1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng y 0.001 ng) que sirvieron de curva patrón de concentraciones conocidas. Teniendo esta curva de calibración se metieron ahora las muestras de ADN obtenidas del ensayo de infección en las placas de 48 pozos y se cuantificó el número de copias genómicas de la proteína NS1 de PVC de 1 a 14 días lo cual sirvió para construir una curva de replicación viral de PVC.

En tubos de PCR de 0.2 mL se colocaron 12.5 μ L de Maxima SYBR Green/qPCR Master Mix 2X, 1 μ L del iniciador F, 1 μ L del iniciador R, 9.5 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de ADN de cada una de las muestras obtenidas de los ensayos de infección y además de las diluciones (1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng y 0.001 ng). Esta reacción se metió en un equipo

de q-PCR (Rotor-Gene Q Qiagen®) bajo las condiciones presentadas en la figura 23. El cálculo de número de copias genómicas se hará de la misma manera que para PVCMAN.

3.7. Fase temprana y Fase tardía de infección por PVC

3.7.1. Ensayo de infección *in vitro* (botellas de 12.5 cm²).

Para cuantificar la expresión de los genes IFN β , IFIT1 e IFIT3 se realizaron ensayos de infección en células MDCK con PVC, durante periodos establecidos por la curva de replicación viral de PVC determinada con anterioridad, donde se delimita una fase inicial (día 1), una fase temprana (día 8) y una fase tardía (día 11) de infección por PVC. Con los mismos tratamientos que en la placa de 48 pozos. Esto con el fin de establecer las relaciones e interacciones entre el número de copias genómicas de PVC y el número de transcritos de RNAm de VP2, NS1, IFN β , IFIT1 e IFIT3; utilizando como gen normalizador el GDPH. Los tratamientos serán los mostrados en la tabla 5. Los ensayos de infección se realizaron en botellas de cultivo celular de 25 mL (12.5 cm²). Los ensayos se repitieron 3 veces para poder realizar el análisis estadístico.

Se pusieron a a crecer para todos los tratamientos 300 000 células/botella durante 24 horas para obtener una confluencia de al menos 80%. En 4 tubos estériles de 50 mL (4 tratamientos: MDCK, IFN, IFN/PVC y PVC) se colocaron 27 000 000 000 células MDCK (300 000 cels/botella), 27 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES. Se homogeneizó y se colocaron 3 mL del inóculo por botella y se incubaron a 37°C durante 24 horas o hasta una confluencia de la monocapa del 80%.

3.7.1.1. Control (Células MDCK sin infectar).

Con una monocapa de 80% a las 24 horas se retiró el medio y se agregó MEM con SFB 10%, A/A y HEPES por botella. Las botellas se incubaron a 37°C durante 1, 8, y 11 días según la fase de infección.

3.7.1.2. Células MDCK tratadas con IFN exógeno.

A las 24 horas (monocapa de 80%) se retiró el medio de las botellas y se lavó cada una con 3 mL de PBS; se agregó de nuevo 3 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES y



además 100 000 U/ μ L (VIRBAGEN OMEGA Interferón Omega) y se incubaron las botellas por 2 horas a 37°C. Se retiró el medio con IFN, se guardó y se lavó la monocapa con PBS. Finalmente se adicionó medio fresco, antibiótico y HEPES a cada botella y se dejaron en incubación a 37 °C (1, 8 y 11 días).

3.7.1.3. Células MDCK tratadas con IFN exógeno infectadas con PVC.

A las 24 horas (monocapa 80%) se retiró el medio de las botellas y se lavó cada una con 3 mL de PBS; se agregó de nuevo 3 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES y además 100 000 U/ μ L (VIRBAGEN OMEGA Interferón Omega) y se incubaron las botellas por 2 horas a 37°C. Se retiró el medio con IFN, se guardó y se lavó la monocapa con PBS. Finalmente se adicionó medio fresco, antibiótico y HEPES a cada botella y 1×10^6 partículas virales de PVC (MOI 100:1) y se dejaron en incubación a 37 °C (1, 8 y 11 días).

3.7.1.4. Células MDCK infectadas con PVC.

A las 24 horas (monocapa 80%) se retiró el medio de las botellas y se lavó cada una con 3 mL de PBS; se agregó de nuevo 3 mL de MEM con SFB 10%, A/A y HEPES y se incubaron las botellas por 2 horas a 37°C. Se retiró el medio y se lavó la monocapa con PBS. Finalmente se adicionó medio fresco, antibiótico y HEPES a cada botella y 1×10^6 partículas virales de PVC (MOI 100:1) y se dejaron en incubación a 37 °C (1, 8 y 11 días).

Al final de los ensayos sea fase inicial (día 1), temprana (día 8) o tardía (día 11) se recuperó el sobrenadante de cada botella y se guardó en tubos estériles de 1.5 mL y las células que aún quedaron adheridas en la monocapa se desprendieron con 1000 μ L de TRIZOL (Invitrogen). Todos los tubos se guardaron a -4°C para su posterior extracción de ARN y su cuantificación de copias genómicas de PVC, IFN β , IFIT 1 e IFIT 3 por q-PCR y RT-qPCR

3.7.2.Extracción RNA

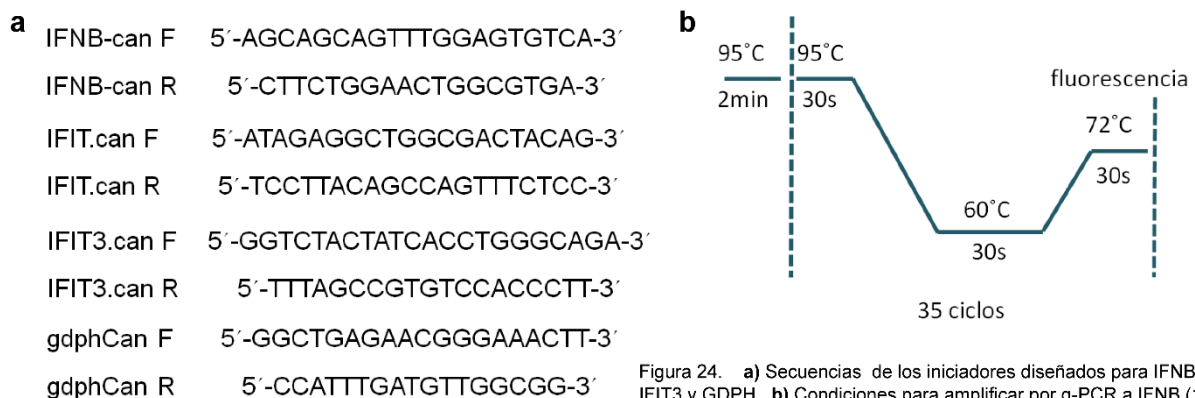
Se estandarizó la extracción de RNA de los ensayos de infección fase inicial, temprana y tardía de infección por PVC. de los 4 tratamientos propuestos. Esto para cuantificar el



número de transcritos de RNAm de VP2, NS1, IFN β , IFIT 1 e IFIT 3 y el gen normalizador de GDPH. La extracción se realizó siguiendo el protocolo de TRIZOL® según las indicaciones del fabricante (Invitrogen) anexo 4. La pastilla obtenida de RNA se resuspendió en 15-20 μ L de agua DEPC al 1% (Diethyl dicarbonato) libre de RNAsas. Para verificar la calidad de la extracción se hizo una electroforesis con un gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador (BIO-RAD Universal Hood II ®).

3.7.3. DISEÑO INICIADORES para PCR y RT-qPCR

Además de los iniciadores ya descritos para la proteína no estructural VP2 y NS1 se diseñaron iniciadores para IFN β , IFIT1 e IFIT3 y del gen normalizador GDPH (figura 24). Los iniciadores se diseñaron a partir de secuencias reportadas de cánidos y carnívoros terrestres en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias en el programa DNAMAN (Lynnon Biosoft, 2015), y diseñaron un par de iniciadores para cada proteína de interés.



d

3.7.4. Síntesis de cDNA por RT-qPCR

Del ARN extraído por las técnicas y protocolos ya descritos anteriormente, se le agregó DNAsa 1 μ L (Thermo Scientific DNase I) y se corrió un gel de agarosa al 1.2% para verificar la calidad de la extracción de ARN. Ya con el RNA limpio y en diluciones de



100 ng/ μ L por muestra se procedió a la síntesis de la cadena complementaria de cada ARN, para lo cual se utilizó un kit (AMV first strand cDNA síntesis Kit de New England Biolabs).

Para la síntesis de cDNA en un tubo estéril de 200 μ L (PCR) se agregaron 1 μ g de RNA, 2 μ L de oligos d(T) y cpb 8 μ L de agua estéril. Y se mete a termociclador a ciclo cDNA con las condiciones mostradas en la figura 25a. Se saca tubo de termociclador y se mantiene a 4°C hasta su uso; se agrega 10 μ L de AMV reaction mix, y 2 μ L de AMV enzyme mix, se mete a termociclador a ciclo RTNEU con las condiciones mostradas en la figura 25b. Finalmente se agregan 30 μ L de agua estéril. Se almacenan los tubos a -20°C para evitar la degradación del cDNA.

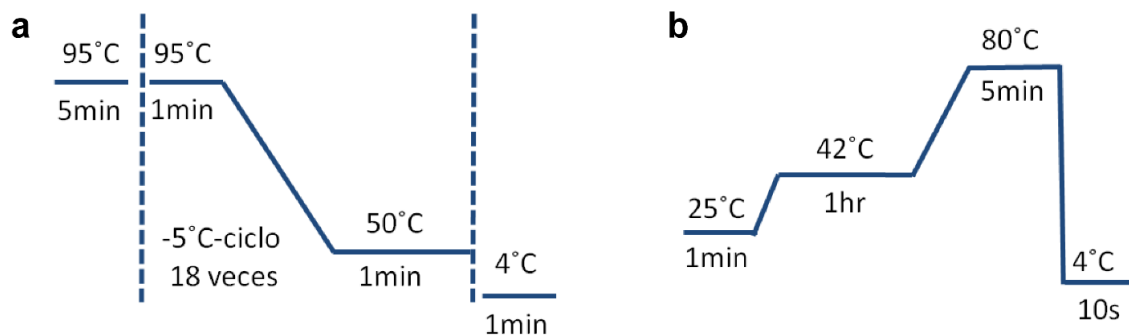


Figura 25. a) Condiciones para primer parte de la síntesis de cDNA. b) condiciones de segunda parte de amplificado de cDNA.

3.7.5. Transcritos de RNAm de (VP2, NS1, IFN β , IFIT1 e IFIT3) q-PCR

Se realizó primero un PCR con las condiciones mostradas en la figura 23 y 24 para verificar que solo se amplificó un producto por par de iniciadores utilizados. Estos amplificados sirvieron como controles positivos durante el q-PCR. De los amplificados de GDPH se hicieron diluciones de 100 y 200 ng para calibrar una curva de concentraciones en el equipo ROTOR GEN.

En tubos de PCR de 0.2 mL se colocaron 12.5 μ L de Maxima SYBR Green/qPCR Master Mix 2X, 1 μ L del iniciador F, 1 μ L del iniciador R, 9.5 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de ADN de cada una de las muestras obtenidas de los ensayos de infección y además de las diluciones de GDPH (100 y 200 ng). Esta reacción se meterá en un equipo de q-PCR (Rotor-Gene Q Qiagen®) bajo las condiciones presentadas en la figura 24. Se

metieron 2 tubos de concentraciones conocidas de GDPH gen normalizador de expresión y por cada muestra a analizar se metió también una reacción para GDPH y que sirviera de punto de comparación entre tiempo y tratamiento.

Para hacer el ajuste de la estimación de incrementos en la expresión de los genes medidos se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Reportado por Livak y Schmittgen en 2001.

3.8. Análisis Estadístico

Para establecer si existen diferencias significativas entre el número de copias genómicas de PVC a lo largo de un periodo de infección viral, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y para establecer las diferencias significativas entre las medias de cada tiempo de infección se realizó un análisis t-student ($p > 0.001$).

Del mismo modo para establecer si existen diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos tanto en la fase inicial, la fase temprana y en la fase tardía se estimó mediante ANOVA con una $p > 0.05$. Las diferencias entre los niveles de expresión de los genes VP2, NS1, IFN β , IFIT 1 e IFIT3 en las diferentes fases de infección se establecieron mediante un arreglo de 3 factores para saber las diferencias entre cada factor (fase temprana, fase tardía-con y sin infección por PVC). Se construyeron las asociaciones y las diferencias entre fases de infección y la presencia o no de PVC en cada variable respuesta (t-student $p < 0.001$).

Se correlacionó la presencia de PVC con la mitocondria a través de microscopia electrónica, reportándose el porcentaje de asociación, estableciendo una relación directa entre la cantidad de PVC en células infectadas por PVC (correlación de Pearson).

Para todos los análisis se utilizaron los programas R, Rstudio, JMP, Origin 8 y el diseño de graficas se realizó con Adobe Illustrator 10.



Capítulo IV

RESULTADOS

4.1. CULTIVO Y AMPLIFICADO PLÁSMIDO PVCMAN

Se logró el crecimiento del plásmido PVCMAN en medio LB, y la extracción de ADN plasmídico por el protocolo de Lisis alcalina (anexo 1) (Figura 26a). Las condiciones utilizadas en el PCR permitieron obtener un amplificado de la proteína VP2 de 800 pb. Este producto fue purificado con el protocolo de purificación con silica e isotiocianato de guanidina para utilizarse en los ensayos de cuantificación de viriones en células infectadas (figura 26b y 26c).

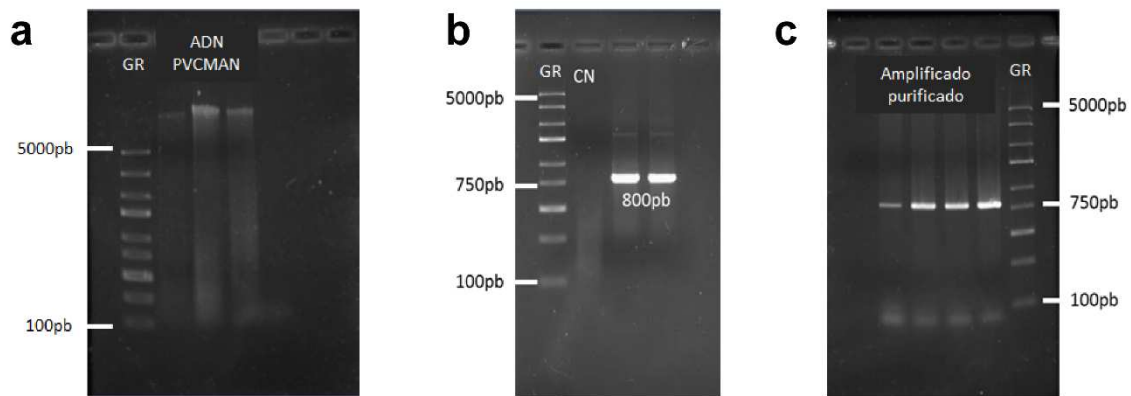


Figura 26. Geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio para la visualización de ADN en el transiluminador. **a)** Extracción de ADN del plásmido PVCMAN, buena calidad y cantidad. **b)** Amplificado VP2 de PVCMAN fragmento de 800 pb, se observan amplificados inespecíficos. **c)** Purificado del producto de PCR del amplificado de 800 pb de la proteína VP2 (silica-isotiocianato de guanidina), se logra una buena purificación del producto. GR (marcador de peso molecular, GeneRuler express).

4.2. CULTIVO CÉLULAS MDCK E INFECCIÓN CON PVC

Las células MDCK fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de 80-90%, fueron observadas mediante un microscopio de objetivos invertidos (figura 27a). Se realizó la transfección viral y pasados 14 días se comenzó a observar el efecto citopático, como células redondeadas o muy filamentosas, formación de sincitios, agregación celular en



forma de racimos de uvas y otras modificaciones estructurales debidas a la infección viral con la cepa wt de PVC (Figura 27b y 27c).

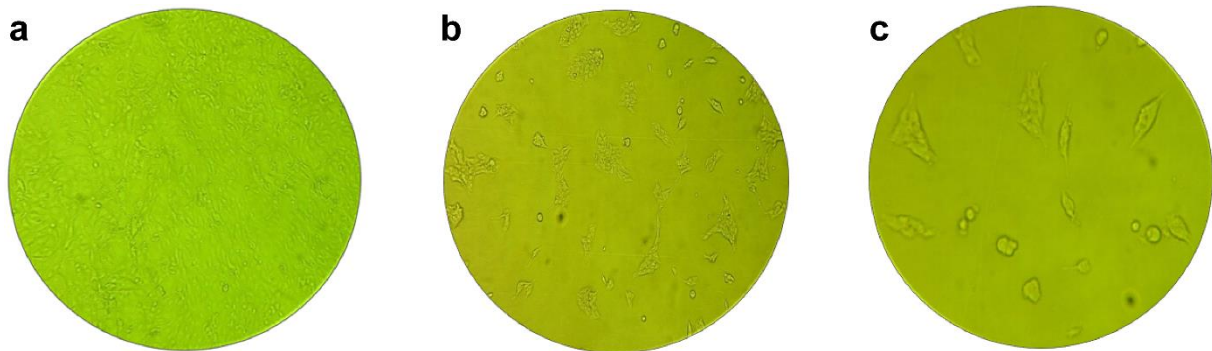


Figura 27. Fotomicrografías de células MDCK. **a)** Células MDCK (40X) sin infectar con una confluencia casi del 100%. **b)** Células MDCK infectadas con PVC 14 días postinfección (40X); e observan células redondeadas y cúmulos en forma de racimo. **c)** Aumento 100X de b se observa a detalle el daño estructural en las células y vacuolización celular.

4.3. CULTIVO PVC *in vitro*

Se hicieron varias infecciones virales en células MDCK para así tener la mayor cantidad de virus replicante disponible. Posteriormente se realizaron ensayos de infección celular con PVC, y las células se mantuvieron en observación cada 24 horas para tener un registro de los efectos de daño celular debido a la infección viral (figura 28). Se observó el comienzo de daños en el día 8 y para el día 11 y 14 estos fueron más evidentes, mostrando incluso células en apoptosis. Estos datos mostraron que las células MDCK eran permisivas a la infección por PVC. La monocapa de células infectadas con PVC solamente fueron las que mostraron un mayor daño desde las etapas tempranas (día 5 postinfección), mientras que las células que fueron tratadas con IFN exógeno mostraron una disminución en la replicación viral, lo que permitió que las células adheridas sobrevivieran por más tiempo y tuvieran menores daños celulares.

4.3.1. EXTRACCIÓN ADN Y AMPLIFICADO DE VP2 Y NS1 POR PCR

A partir de los cultivos infectados con PVC con y sin interferón, se realizó la extracción de ADN (anexo 2) (Figura 29). De estas extracciones se logró la amplificación de un fragmento de la proteína VP2 (800 pb) y NS1 (130 pb), evidenciando la infección viral

(figura 29a, 29b y 29c respectivamente). Estas mismas extracciones fueron utilizadas para evaluar, con base en el número de copias genómicas, la curva de replicación viral.

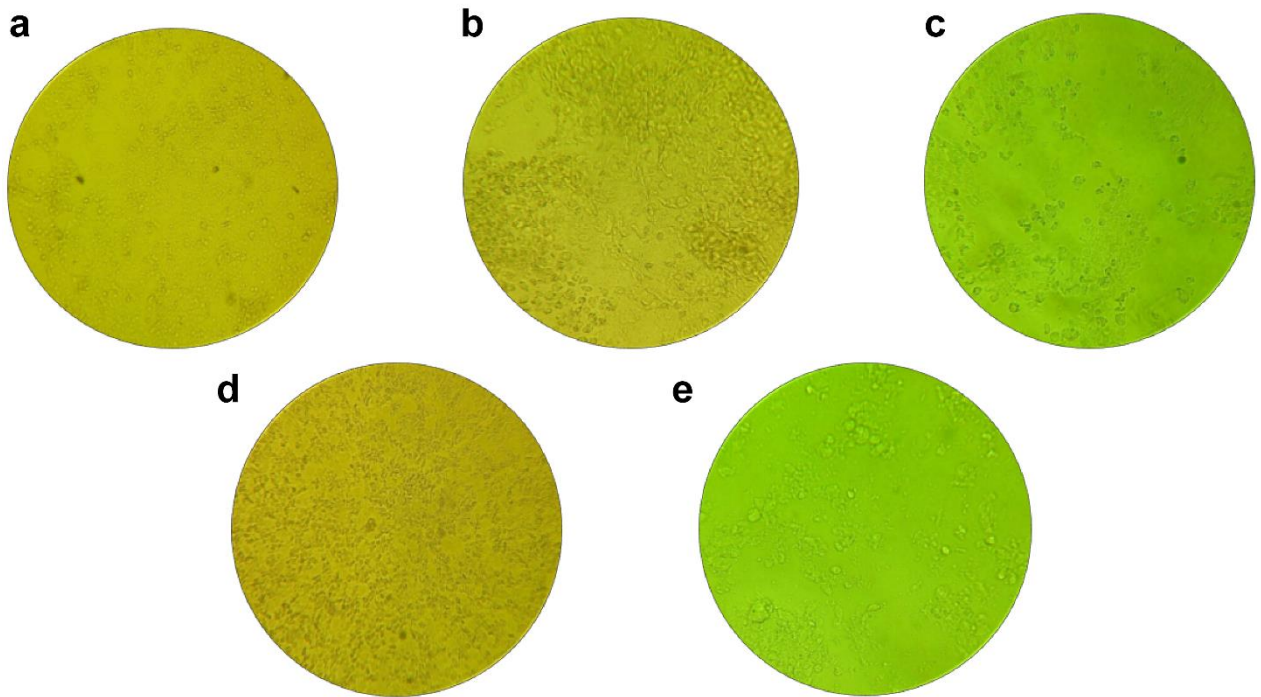


Figura 28. Fotomicrografías de células MDCK (40X) al día 14 postinfección. **a)** Células MDCK sin infectar con una confluencia casi del 80-90%. **b)** Células MDCK tratadas con IFN (10 000U) monocapa al 100%. **c)** Células MDCK tratadas con IFN (10 000U) e infectadas con PVC, confluencia del 40-50%. **d)** Células MDCK tratadas con IFN (100 000U) infectadas con PVC, confluencia del 90%. **e)** Células MDCK infectadas con PVC, confluencia del 20-30%. Las células infectadas con PVC a los 14 días postinfección se observan redondas con daño estructural y vacuolizadas.

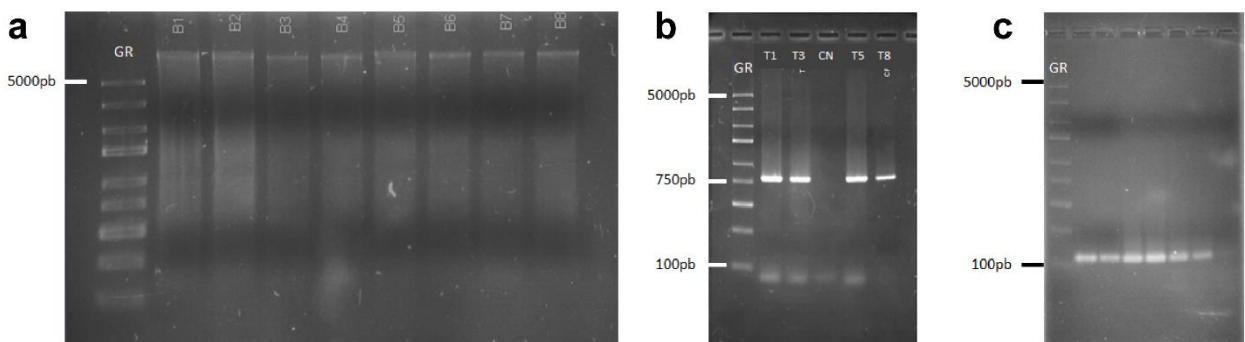


Figura 29. Geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio. **a)** Extracción ADN de las diferentes infecciones *in vitro* en células MDCK con PVC, se observa buena cantidad y calidad de ADN. **b)** Amplificado por PCR de VP2 (800pb) no amplifica control negativo. **c)** Amplificado por PCR de NS1 de diversas infecciones *in vitro*. GR (marcador de peso molecular Gene Ruler express).

4.4. CURVA PATRÓN NS1 AMPLIFICADO POR q-PCR

Para la cuantificación primero se construyó una curva patrón usando el fragmento purificado de la proteína NS1 de PVC (figura 29c). Esto nos permitió cuantificar el número de copias genómicas de PVC en cada uno de los ensayos de infección. Las condiciones utilizadas en el q-PCR resultaron ideales para lograr el amplificado de tamaño esperado. (figura 30c). Las CT's (ciclo donde la fluorescencia aumenta exponencialmente) obtenidas para cada concentración se utilizaron para establecer una recta, con la cual se estimaron las concentraciones de copias genómicas por muestra (figura 30a y 30b). Es decir, a partir de las concentraciones conocidas de ADN de la proteína NS1, se pudo analizar las muestras problema, donde se desconocía la concentración de ADN. Este análisis permitió cuantificar la concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN y calcular así el número de copias virales contenidas en cada muestra.

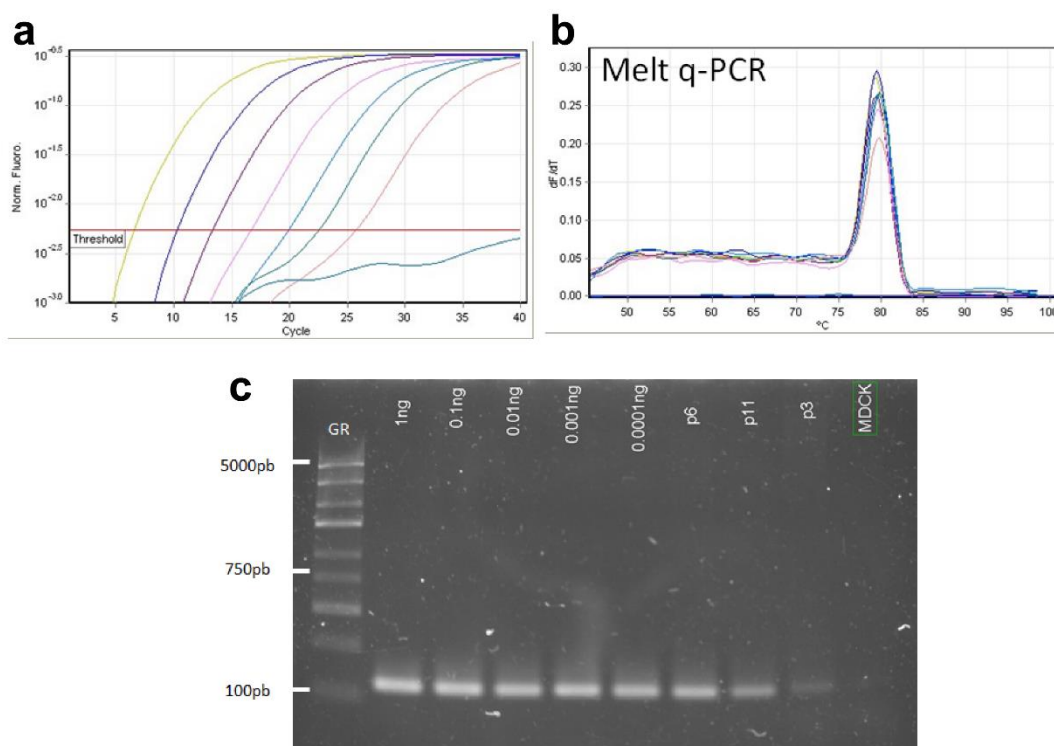


Figura 30. q-PCR de curva patrón proteína NS1. **a)** Fluorescencia emitida por cada muestra, indica el ciclo donde inicia. **b)** Melt q-PCR solo amplifica un pico correspondiente a la banda de 130 pb de NS1. **c)** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, amplificados de la proteína NS1 (130 pb), se observa solo la banda esperada. GR (marcador de peso molecular Gene Ruler express).

4.5. CURVA DE REPLICACIÓN VIRAL

Se realizaron 4 ensayos de infección en células MDCK con PVC y se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 31. Se calculó un promedio del número de copias genómicas de NS1 obtenidos por qPCR de cada tiempo postinfección (Figura 31). El análisis de ANOVA estableció que existen diferencias en el número de copias genómicas a lo largo del período de infección viral y con una t-student ($p < 0.001$) se establecieron diferencias entre los diferentes días de infección.

Así se tuvo que el día 5 y 8 son diferentes estadísticamente al día 1 y también son diferentes entre sí; el número de copias genómicas es estadísticamente diferente en estos 3 días (Figura 31). Con estos resultados se decidió tomar como fase inicial (día 1), fase temprana (día 8) y fase tardía (día 11).

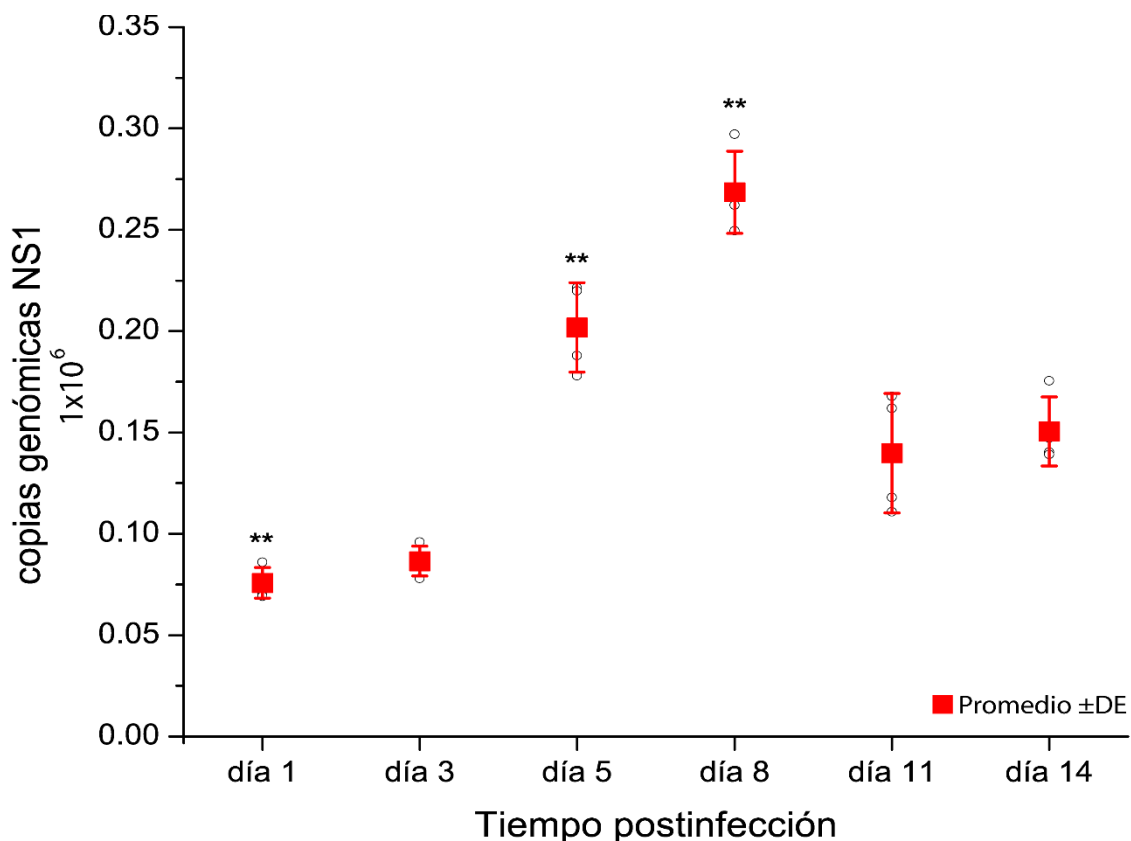


Figura 31. Curva de replicación viral de PVC. Se contruyó a partir de los datos obtenidos por q-PCR, se estimó el número de copias genómicas en cada día de cada uno de los ensayos. Se muestran los 4 ensayos de infección en un período de 14 días; se muestra el promedio y DE por día según el número de copias genómicas de NS1. Se toma como fase temprana (día 8) y fase tardía (día 11) postinfección. (** diferencias significativas $p < 0.001$).

4.6. CURVA REPLICACIÓN CÉLULAS TRATADAS CON IFN EXÓGENO

Al cuantificar el número de copias genómicas de NS1 en los ensayos realizados con las dos dosis de IFN exógeno (10 000 y 100 000 U/ μ L) se obtuvieron los siguientes resultados:

Las células tratadas con IFN a 10 000 U/ μ L, en los días 1, 3, 5 y 8 tuvieron un número de copias genómicas de NS1 estadísticamente mayor incluso que las células infectadas solo con PVC (figura 32a). Es decir, se favoreció la replicación viral de PVC con esta dosis de IFN. Por otro lado, el número de copias genómicas en células tratadas con 100 000 U/ μ L de IFN tuvieron una disminución estadísticamente significativa en los días 1, 3, 5 y 8 (figura 32b). La cuantificación de copias genómicas con esta dosis de IFN mostro una disminución en la replicación viral de PVC, en los primeros días postinfección, por este motivo se decidió utilizar esta dosis en ensayos posteriores, ya que parece activar tempranamente la respuesta inmune del hospedero.

Ambas dosis de IFN en los días 11 y 14 no mostraron diferencias en cuanto al número de copias genómicas de NS1 (figura 32a y 32b), lo que sugirió que la replicación viral de PVC en estos tiempos se estabiliza no importando la dosis de IFN.

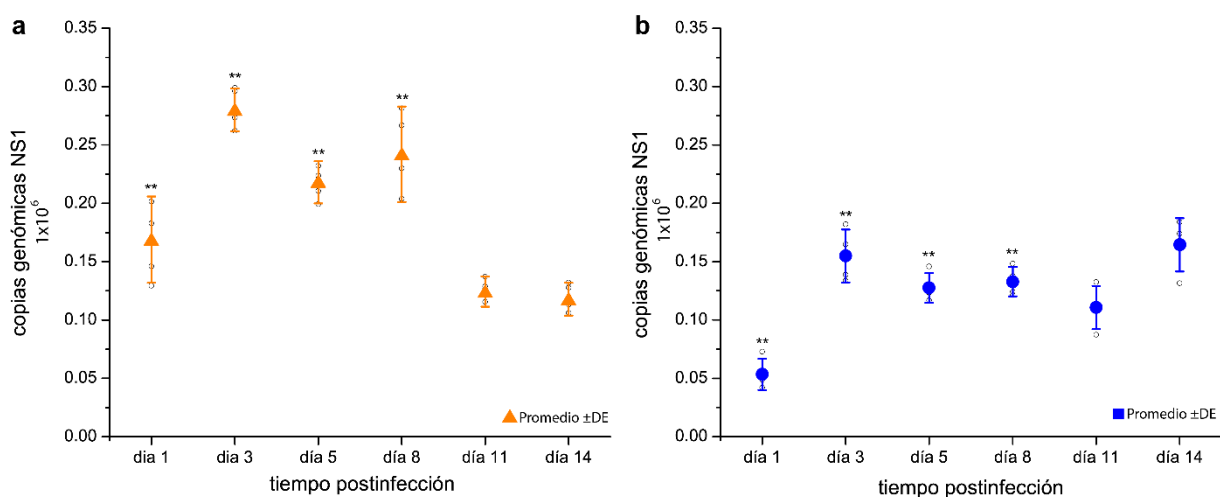


Figura 32. Curva de replicación viral de PVC en células MDCK tratadas con IFN exógeno. **a)** El número de copias genómicas de NS1 con una dosis de IFN de 10 000U, muestra durante los días 1, 3, 5 y 8 un aumento estadísticamente significativo con respecto a los mismos días con una dosis de IFN de 100 000U es menor **(b)**. (** diferencias significativas $p < 0.001$).



4.7. FASE TEMPRANA Y FASE TARDÍA DE INFECCIÓN

El análisis estadístico muestra que ambas dosis de IFN son estadísticamente diferentes entre sí y con las células infectadas solo con PVC. Con esta información se establecieron 3 fases durante la infección por PVC en células MDCK tratadas o no con IFN a una dosis de 100 000 U/ μ L (figura 33); fase inicial (día 1), fase temprana (día 8) y fase tardía (día 11). En los siguientes ensayos solo se cuantificaron las proteínas de interés durante estas fases de infección viral y se utilizó solo la dosis de IFN de 100 000 U/ μ L por mostrar disminución en la replicación viral de PVC (figura 33).

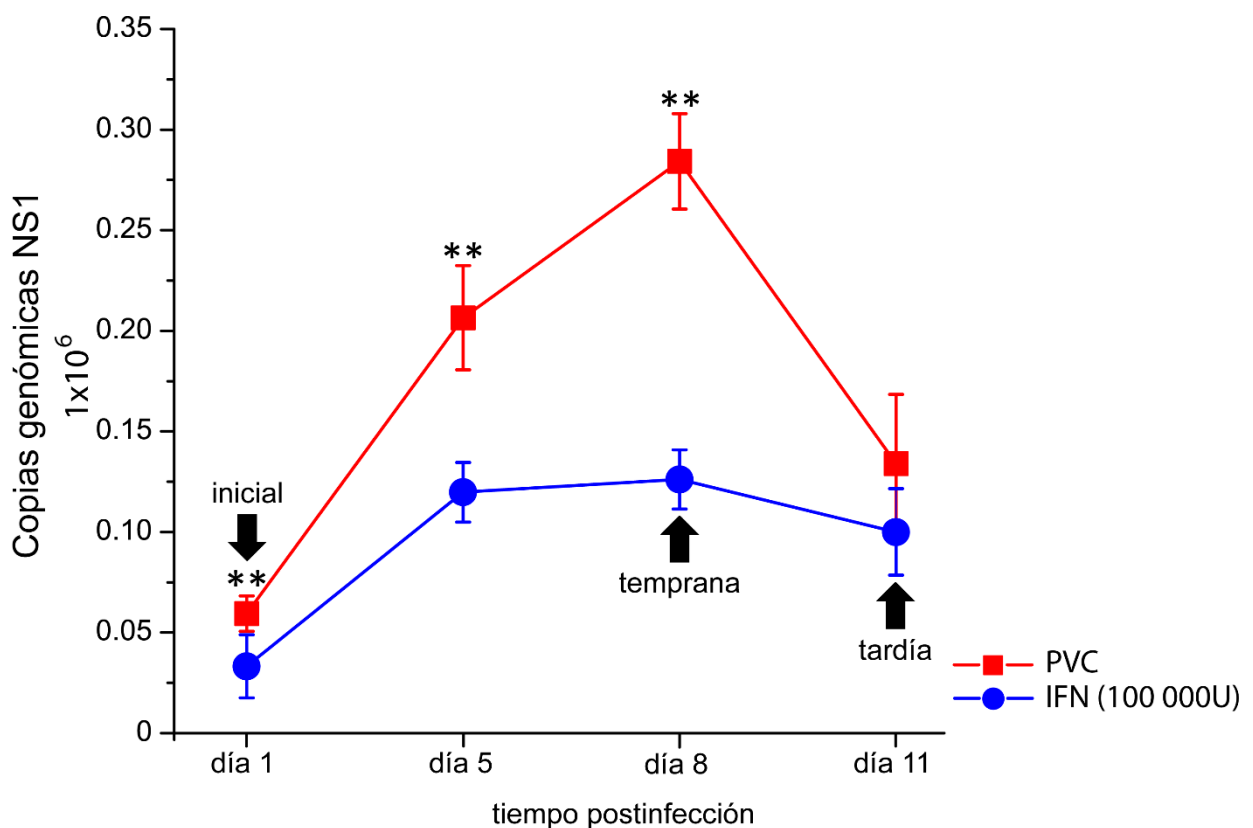


Figura 33. Curva Replicación viral de PVC. Se establecen 3 fases durante la infección por PVC; fase inicial (día 1), fase temprana (día 8) y fase tardía (día 11). El tratamiento con IFN (100 000U) disminuyó significativamente la replicación de PVC (puntos azules) con respecto a células solo infectadas con PVC (cuadros rojos) (** diferencias significativas $p < 0.001$)

Durante los ensayos realizados durante la fase temprana (día 8) y tardía (día 11) de infección por PVC, se hicieron observaciones diarias de las células para llevar un registro de los cambios morfológicos celulares debidos a la infección por PVC (figura 34). Se tomaron microfotografías los días en los cuales se detuvo la infección. Las células MDCK sin infectar conservaron hasta la fase tardía (día 11) la morfología de células sanas y conservaron el 100% de la monocapa (figura 34a). Las células MDCK tratadas con IFN dosis 100 000 U/ μ L y sin infectar conservaron de igual manera su morfología y una monocapa al 100% (figura 34b). Por el contrario, las células MDCK tratadas con IFN dosis 100 000 U/ μ L infectadas con PVC, presentaron morfológicamente ensanchamiento celular y vacuolización, pero se conservando alrededor del 60% de la monocapa (figura 34c). Las células infectadas con PVC mostraron daño evidente de las células aún adheridas, hubo vacuolización, ensanchamiento celular y células apoptóticas, la monocapa solo se conservó en un 20% al final de la fase tardía (día 11) (figura 34d).

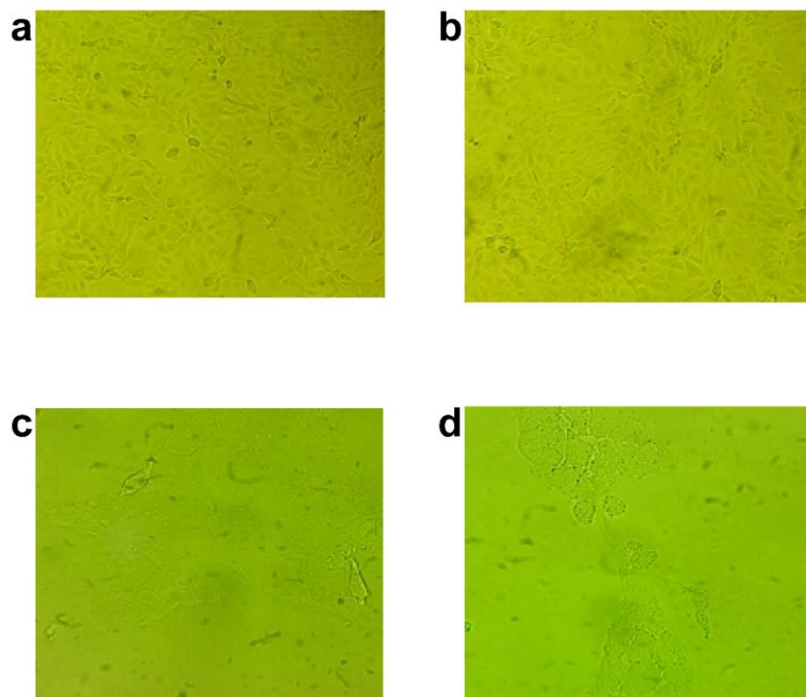


Figura 34. Microfotografías de las células infectadas con PVC, fase tardía (día 11). **a)** Células MDCK sin infectar (40X), monocapa al 100%. **b)** Células MDCK tratadas con IFN (100 000U), monocapa al 100% (40X). **c)** Células tratadas con IFN (100 000U) e infectadas con PVC, monocapa al 60% (100X). **d)** Células infectadas con PVC, monocapa 20% (100X).

Se realizaron las extracciones de RNA con TRIZOL (anexo 4), (figura 35a) para sintetizar la cadena complementaria de ADN (cDNA). Para verificar la síntesis de cDNA se hizo un PCR con los iniciadores de β -actina como control (figura 35b), mediante esta RT-PCR se obtuvo un amplificado de 370 pb correspondiente al esperado para la β -actina. Con estos resultados se procedió a la extracción de RNA de los ensayos realizados y la amplificación-cuantificación de las proteínas de estudio (VP2, NS1, IFN β , IFIT1, IFIT3 y GPDH) (figura 35c-h) por RT-qPCR. Se logró amplificar una sola banda de todas las proteínas por q-PCR.

4.7.1. CUANTIFICACIÓN TRANSCRITOS RNAm q-PCR

Los resultados de la cuantificación del número de copias genómicas y de transcritos de RNAm de las proteínas: VP2, NS1, IFN β , IFIT1 e IFIT3 de los ensayos de infección realizada mediante RT-qPCR se muestran en las figuras 36, 37 y 38. Los resultados en las gráficas se muestran según la fase de infección y tratamiento.

4.7.1.1. TRANSCRITOS PROTEÍNAS VP2 Y NS1

Se cuantificaron los transcritos de las proteínas NS1 y VP2 de PVC y se establecieron dinámicas de replicación viral. La primera proteína en expresarse es la NS1 (fase temprana) (figura 36a); seguida de una sobreexpresión de VP2 (fase tardía) (figura 36b). La primera está relacionada con una replicación activa de PVC y la segunda con la formación de viriones nuevos listos para salir del citoplasma celular (figura 36). Existe una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de VP2 en la fase temprana y tardía durante la infección activa por PVC; se observa la misma dinámica en la expresión de NS1. En células tratadas con IFN (100 000 U/ μ L) y además infectadas con PVC, existe una diferencia significativa en el incremento en la expresión durante ambas fases de infección. Tanto la expresión de VP2 como la de NS1 se ve drásticamente disminuida en las células tratadas con IFN, lo que sugiere se activan tempranamente mecanismos antivirales que ayudan a disminuir la replicación de PVC.



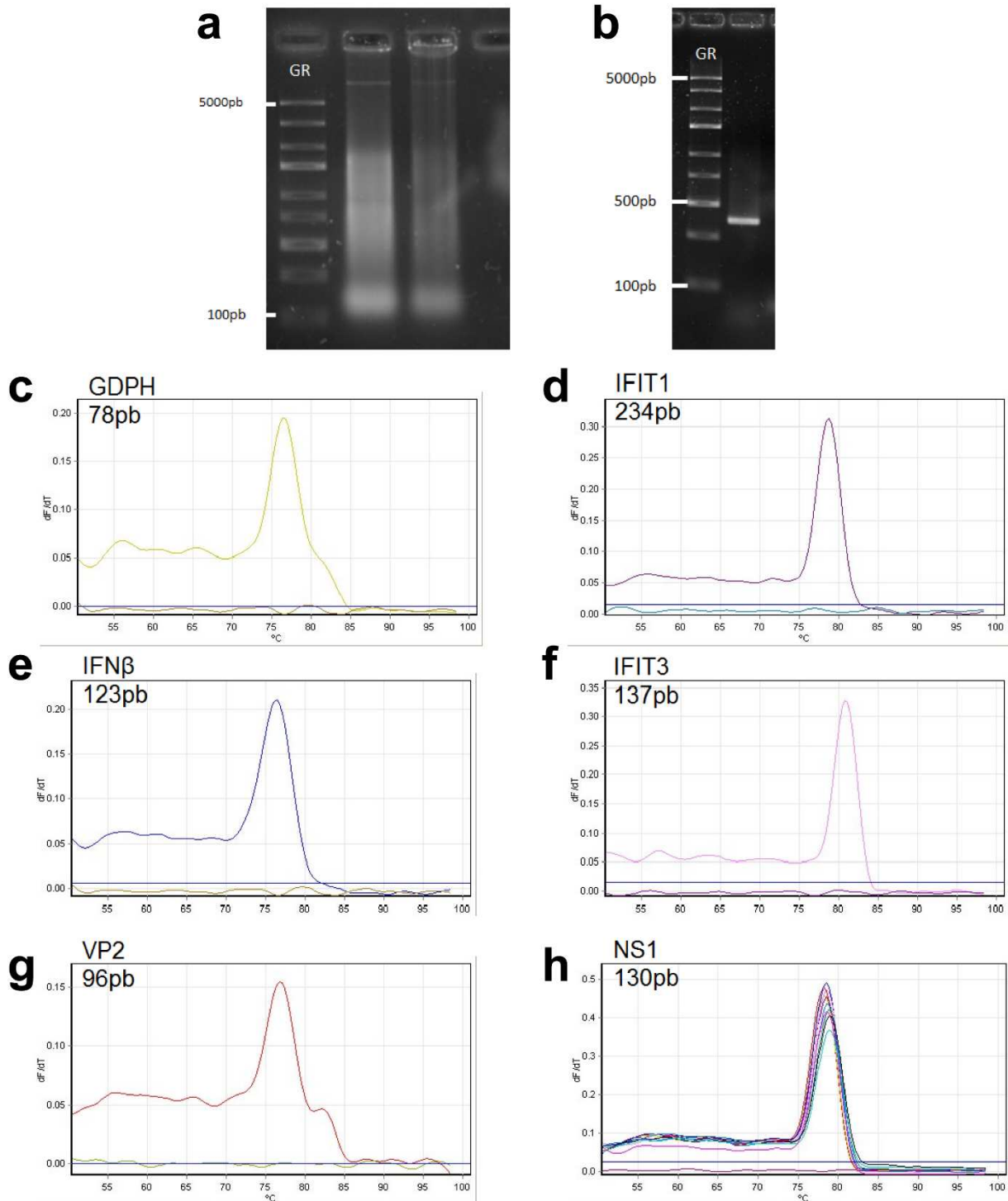


Figura 35. Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. **a)** Extracción RNA por TRIZOL. **b)** Amplificado b-actina para corroborar que la RT-PCR se estandarizó de manera adecuada. GR (marcador de peso molecular Gene Ruler express). Estandarización q-PCR para proteínas GPDH, IFIT1, IFN β , IFIT3, VP2, NS1. **c)** Amplificado GPDH, banda de 78 pb). **d)** Amplificado IFIT1, banda de 234 pb. **e)** Amplificado IFN β , banda de 123 pb. **f)** Amplificado IFIT3, banda de 137 pb. **g)** Amplificado VP2, banda de 96 pb. **h)** Amplificado NS1, banda de 130 pb. Solo se observa un amplificado correspondiente al tamaño esperado para cada gen y los controles negativos no amplificaron.

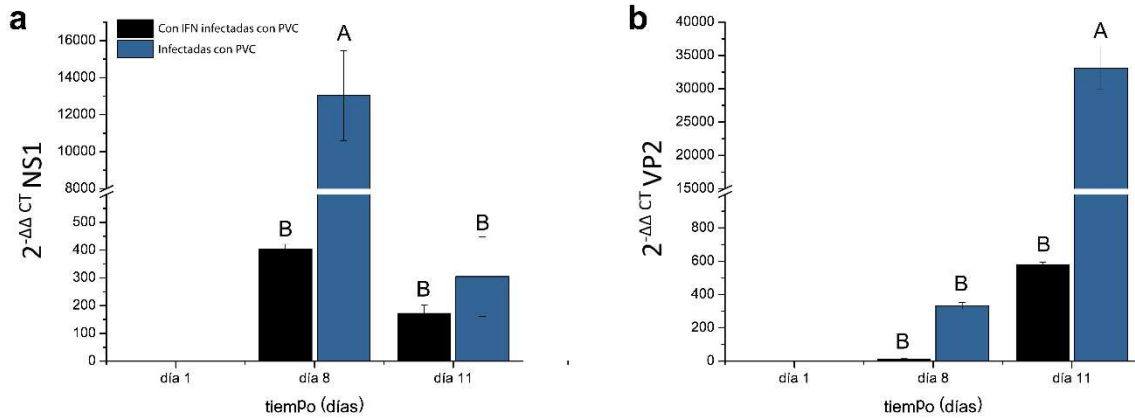


Figura 36. Cuantificación por q-PCR de la expresión de NS1 y VP2. **a)** Incremento en la expresión de la proteína NS1, durante la fase temprana y tardía de infección por PVC, siendo el día 8 el pico de mayor expresión de la proteína. **b)** Incremento en la expresión de la proteína VP2 en ambas fases de infección; el pico de expresión se da en el día 11. Se muestra en las barras azules las células infectadas con PVC y en barras negras las células tratadas con IFN (100 000U) e infectadas con PVC. (Letras iguales no existe diferencia estadísticamente significativa; letras diferentes tienen diferencia estadística significativa).

4.7.1.2. TRANSCRITOS IFN β

En cuanto a la cuantificación del número de transcritos de RNAm de IFN β se encontró que existen niveles basales en las 3 fases de infección en células que no fueron infectadas ni tratadas con IFN exógeno (figura 37). Lo mismo se observó en células tratadas con IFN exógeno, lo que sugiere que se necesita además de la presencia de IFN, un estímulo extra como el reconocimiento de los viriones de PVC para desencadenar la producción y expresión de IFN β .

En células tratadas con IFN exógeno (100 000 U/ μ L) e infectadas con PVC, la expresión de IFN β se inició en la fase temprana (14 incrementos) y se incrementó hasta >360 incrementos (figura 37) en la fase tardía. Ambos estímulos el IFN exógeno y el virión de PVC son probablemente los que desencadenan la expresión de IFN β , para activar con esto mecanismos antivirales de control viral.

El mismo comportamiento de expresión se observa en células infectadas con PVC, solo que los niveles de expresión fueron más marcados, ya que van desde 106 incrementos en la fase temprana, hasta >700 incrementos durante la fase tardía. Esto sugirió una activación temprana de la respuesta inmune innata más eficiente que las células tratadas con IFN exógeno (figura 37).

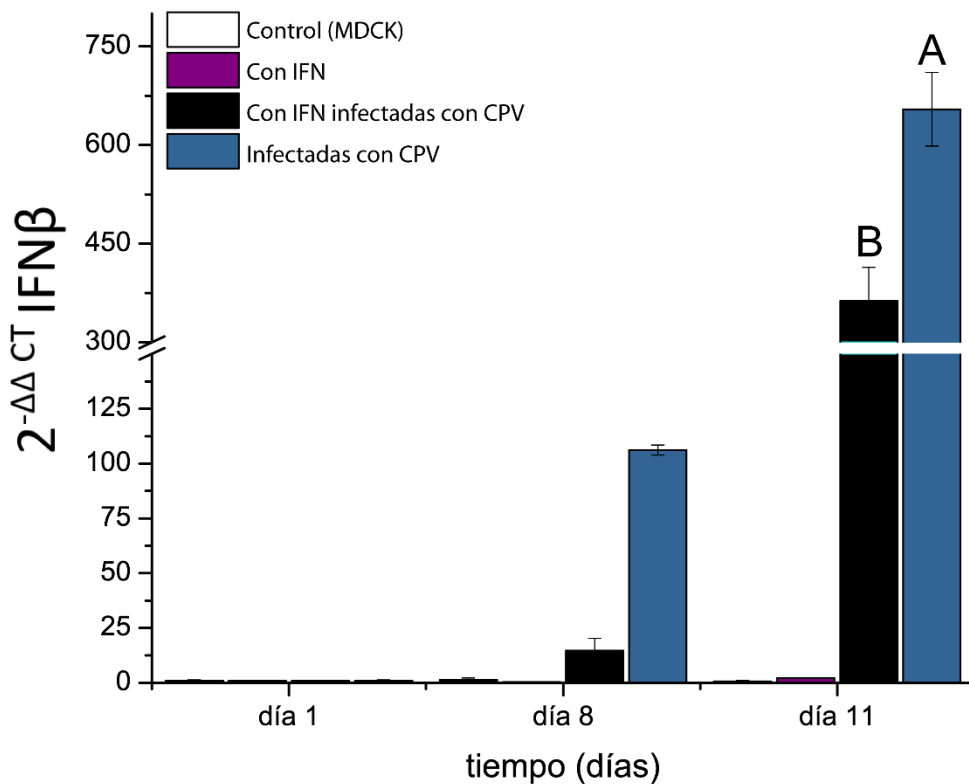


Figura 37. Cuantificación por q-PCR de la expresión de IFN β . Se inicia la expresión de IFN β en la fase temprana (día 8) y aumenta en la fase tardía (día 11) se observa misma tendencia en células infectadas con PVC y células tratadas con IFN e infectadas con PVC, lo que parece activar tempranamente la respuesta inmune innata y con esto existe una disminución de PVC en estas células. (Letras iguales no existe diferencia estadísticamente significativa; letras diferentes tienen diferencia estadística significativa).

4.7.1.3. TRANSCRITOS IFIT1 E IFIT3

En células tratadas con IFN exógeno (100 000 U/ μ L) se cuantificaron niveles basales de IFIT 1 e IFIT 3 en las dos fases de infección (figura 38a y 38b).

En células tratadas con IFN exógeno (100 000 U/ μ L) e infectadas con PVC la proteína IFIT1 se expresó tempranamente (15 incrementos) y alcanzó niveles de expresión (20 incrementos) en la fase tardía (figura 38a). Por otro lado, la proteína IFIT 3 en el mismo grupo de células mostraron incrementos mayores, en la fase temprana (26, incrementos) y en la fase tardía (56 incrementos) (figura 38b). esto sugiere que la proteína IFIT1 se

expresa en menor cantidad que la IFIT3, lo cual puede ser debido a los mecanismos y rutas de señalización activadas en las células.

En células infectadas con PVC la expresión de IFIT1 e IFIT3 tuvo el mismo comportamiento que las células anteriormente descritas, sin embargo, los incrementos $2^{-\Delta\Delta CT}$ fueron mayores. Así la proteína IFIT tuvo en la fase temprana 10 y en la fase tardía, 23 (figura 38a). Mientras que la proteína IFIT3, en la fase temprana tuvo 175 y la fase tardía 660 (figura 38b). Aun cuando los incrementos de $2^{-\Delta\Delta CT}$ en estas células son mayores, esto no fue suficiente para controlar la infección por PVC, como lo muestra el número de copias genómicas.

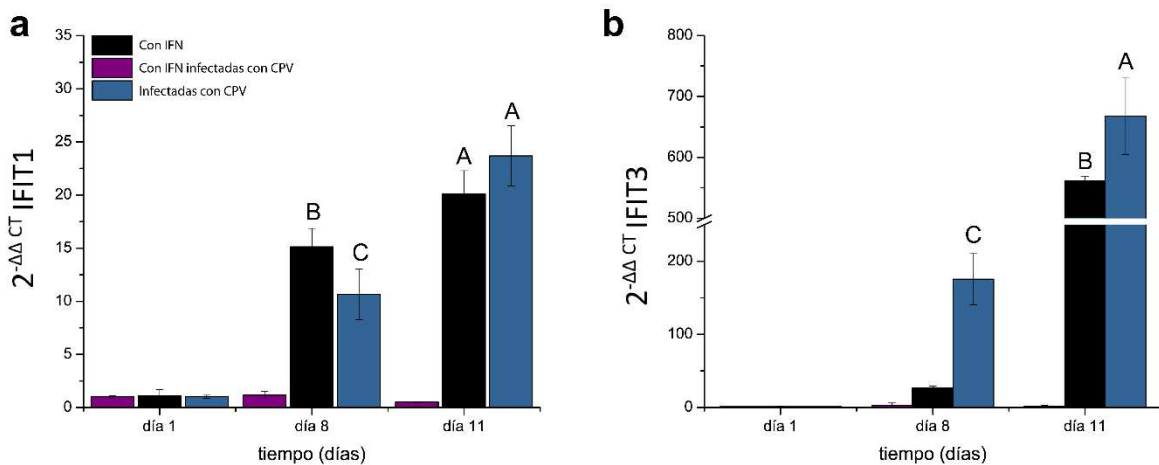


Figura 38. Cuantificación por q-PCR de la expresión de IFIT 1 e IFIT3. Se registran los niveles basales de ambas proteínas en las células sin infectar (fase inicial). **a)** En la fase temprana (día 8) en ambos tratamientos la expresión de IFIT1 es estadísticamente diferente; mientras que en la fase tardía (día 11) la expresión de IFIT1 es igual estadísticamente. **b)** Se registran los niveles basales de IFIT3 en la fase inicial. En la fase temprana la expresión de IFIT3 es estadísticamente menor en las células tratadas con IFN exógeno, con respecto a las células infectadas con PVC; en la fase tardía los incrementos de la expresión de la proteína IFIT3 son estadísticamente diferentes, siendo mayor en las células infectadas con PVC. (Letras iguales no existe diferencia estadísticamente significativa; letras diferentes tienen diferencia estadística significativa).

Capítulo V

DISCUSIÓN

Los virus han montado mecanismos moleculares que les permiten lograr una infección exitosa en una célula hospedera. Por otro lado, el sistema inmunitario del hospedero ha montado mecanismos de control viral lo que le permite sobrevivir y erradicar infecciones virales casi por completo (Pilchmair *et al.*, 2011, 2014). Existe una modulación de ambas respuestas lo que ha permitido por un lado a los virus infectar exitosamente a una célula, pero por otro al hospedero le ha permitido poder sobrevivir controlando la replicación viral. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran y dejan a la luz algunos mecanismos moduladores de la respuesta inmune ante una infección viral, usando como modelo PVC.

Antes de que Parvovirus canino (PVC) se pueda replicar en la célula hospedera y causar infección, los viriones deben cruzar la membrana plasmática y luego dirigir su genoma y sus proteínas accesorias al núcleo para comenzar así una replicación e infección exitosa. PVC se une a la superficie de una célula receptora a través de proteínas de superficie del virión (VP2), es cuando interactúa con estructuras en la célula en este caso receptor de transferrina; comenzando así su entrada en la célula hospedera por endocitosis mediada por clatrina. Ya en el endosoma el pH es ácido y es responsable de cambios conformacionales en las proteínas de la cápside viral de PVC, que son inducidos por la interacción del virión y el pH bajo en la vía endocítica (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). PVC sale del endosoma tardío y llega y se replica en el núcleo, necesita forzosamente que la célula se encuentre en fase de síntesis (S) para iniciar su replicación. El genoma de PVC comprende dos unidades transcripcionales, una que codifica las proteínas de la cápside VP1 y VP2, y la otra las proteínas no estructurales proteínas NS1 y NS2. NS1, sirve como un iniciador y activador de la replicación viral. NS1 está presente en sitios autónomos asociados a replicación (Ihalainen *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se cuantificaron el número de copias genómicas virales de PVC (VP2 y NS1) y se establecieron claramente tres momentos en el ciclo viral, una fase inicial (condiciones iniciales), una fase temprana (día 8) donde el número de copias genómicas se mantiene bajo y da pie a la fase tardía (día 11) donde la replicación viral de PVC crece



exponencialmente. El establecimiento de estas fases de infección nos permitió cuantificar las citocinas proinflamatorias durante una infección viral como lo es el IFN β , responsable del inicio de la transcripción de proteínas antivirales como las IFIT (Fensterl *et al.*, 2011). La proteína NS1 se sobreexpresó durante la fase temprana (día 8) lo que sugiere es la primer proteína que se transcribe durante el inicio de la replicación de PVC, seguida de una sobreexpresión de VP2 durante la fase tardía (día 11) responsable del ensamblado de viriones de PVC. Esta dinámica de replicación viral no había sido reportada completa con anterioridad, en este trabajo se categoriza a NS1 como responsable del inicio de la replicación y a VP2 responsable de la formación de viriones nuevos listos para salir del citoplasma celular.

Las citocinas juegan un papel importante en el inicio y regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (Kagan *et al.*, 2014), y los virus han aprendido cómo bloquear su producción, actividad y transducción de señales. Las funciones de estas moléculas en el hospedero son diversas, los virus pueden neutralizar la actividad de las citocinas y sus homólogos redireccionando la respuesta inmune para su beneficio (Green *et al.*, 2011).

La respuesta inmune innata mediada por el interferón (IFN β), ante infecciones virales proporciona una robusta primera línea de defensa contra patógenos virales invasores (vía MAVS). Tras la detección de virus y posterior producción de IFN β . Se empiezan a expresar cientos de genes regulados por IFN (ISGs), como las proteínas antivirales IFIT lo que conduce a un probable control de la infección viral. Por otro lado, las moléculas de IFN se pueden unir a células con receptores en su superficie celular para IFN e iniciar una cascada de señalización a través del transductor de señal de Janus quinasa y el activador de la transcripción (JAK-STAT). Los IFNs poseen la habilidad de proteger las células de las infecciones virales. La actividad del tipo I (α y β) y del tipo II (γ) es ser parte de los mecanismos de defensa antiviral. Algunos virus bloquean la inducción de IFN responsable de la activación de la señalización por la vía JAK (Janus Kinase) (Transductores y activadores de la transcripción) e inhiben la activación de vías efectoras de IFN induciendo un estado antiviral en la célula al limitar la replicación viral (Alcami y Ulrich, 2000). Esto culmina con la inhibición de la formación de la doble cadena de RNA dependiente de la activación de la proteína quinasa (PKR), fosforilación del factor 2 α de



inicio de la traducción (Eif-2) y el sistema RNAsa L, el cual degrada el RNA viral y arresta o interrumpe la traducción en las células hospederas.

En el presente trabajo los diferentes tratamientos utilizados dilucidan algunos mecanismos moleculares que se activan desde una etapa temprana del desarrollo de una infección viral, lo cual parece ayudar y permitir que las células infectadas logren sobrevivir y controlar la infección viral. Así lo demuestran el número de transcritos de RNAm de IFN β , en células infectadas con PVC y en células tratadas con IFN exógeno e infectadas con PVC. Las células tratadas con IFN exógeno activan tempranamente la expresión de IFN β lo que permite disminuir el número de copias genómicas de PVC desde la fase temprana. Estos niveles de expresión de IFN β aumentan en la fase tardía logrando disminuir la replicación de PVC. En células infectadas con PVC se observaron niveles de expresión mayores pero el número de copias genómicas de PVC no disminuyeron; por el contrario, tuvieron incrementos mayores. Se obtuvieron resultados similares que en infecciones reportadas de los virus: Herpes simple virus, Adenovirus, Cytomegalovirus (Schneider *et al.*, 2014).

Mattei y colaboradores en el 2013 examinaron la respuesta inmune innata a MVMp (minute virus del ratón), infectando MEFs (fibroblastos de embriones de ratón) con MVMp, realizaron un experimento y midieron expresión de IFN I por RT-qPCR durante las primeras 72 horas postinfección. Encontraron una pequeña, pero estadísticamente significativa subregulación de IFN- α e IFN- β , especialmente a 48 horas postinfección. Reportaron también que existe una activación de STAT1. La respuesta de IFN inducida por la infección por MVMp fue similar a la observada con el Virus de la estomatitis vesicular (VSV). Estos resultados demostraron que la infección por MVMp, activa una respuesta de IFN.

Analizaron también si la replicación viral se ve afectada por la señalización a través del IFN- $\alpha\beta$. Y encontraron que el IFN- $\alpha\beta$ conduce a la expresión de varios genes estimulados por interferón (ISGs), induciendo un estado antiviral en células vecinas (Sen, 2007). El VSV, un virus que es sensible a los IFN de tipo I (Ito y Montagnier, 1977), disminuyó su replicación viral. Por el contrario, MVMp se sigue replicando igual en los MEFs deficientes de IFN- $\alpha\beta$ R; Estos resultados sugieren que los bajos niveles de IFN tipo I producidos



durante la infección por MVMp en MEFs no son suficientes para inducir un estado antiviral en el cultivo celular. Caso contrario de VSV donde los niveles bajos de IFN si logran disminuir la replicación viral. Lo que sugiere que estos dos tipos de virus desencadenan vías diferentes de control antiviral, uno parece estar mediado por RIG- I y MAVS (VSV).

El control de la replicación y patogénesis del virus depende de la rápida detección de las partículas virales por la célula y su capacidad para montar una respuesta antiviral inmediata para limitar la propagación del virus a las células vecinas. La respuesta antiviral en la infección por PVC se activa por vías de señalización que involucran RIGI-MAVS que conduce a la inducción transcripcional de genes antivirales como las proteínas IFIT vía IFN β .

Las proteínas inducidas por interferón con repeticiones de tetratricopeptídicas (IFIT) son una familia de proteínas, que son fuertemente inducidas cadena abajo de la señalización del IFN I. El mecanismo molecular de la actividad antiviral del IFIT ha sido estudiado con cierto detalle, incluyendo recientemente su acción mediante la unión directa al ácido nucleico viral, la unión a proteínas virales y hospedadoras y la posible participación en la propagación de la señal inmune antiviral (Vladimer *et al.*, 2014).

Los genes IFIT son rápidamente inducidos por infección de varios virus, puede ser a través de vías IFN-dependientes e independientes. En la última década, se ha relacionado a estas proteínas con la inhibición de las infecciones virales, mediante múltiples mecanismos, por ejemplo, suprimiendo el inicio de la traducción, por la unión a RNA-cap y por secuestro de proteínas o ARN en el citoplasma (Diamon y Farza, 2012).

Además de ser descritas como proteínas antivirales, las IFIT originalmente se describieron por su unión a PPP-ARN, sin disminuir el IFN I en fibroblastos de ratón, macrófagos o células dendríticas que carecen de IFIT1. Posteriormente, se propuso que la disminución de IFIT1 daba como resultado un decremento de la respuesta pro-inflamatoria después del tratamiento con LPS en células (Vladimer *et al.*, 2014).

Las proteínas IFIT median la respuesta inmune innata al interactuar por ejemplo IFIT3 con TBK1, una cinasa importante en la modulación de la respuesta inmune innata. Esta interacción IFIT3-TBK1 permite su unión con MAVS en la mitocondria. Una

sobreexpresión de IFIT3 incrementa la expresión de genes antivirales. (Berchtold y colaboradores, reportaron en 2008 que la sobreexpresión de IFIT2 en macrófagos de ratón reduce múltiples citocinas proinflamatorias aun siendo inoculados con LPS. Esta respuesta puede ser debida a las funciones naturales de las IFIT al unirse directamente con RNA y sobreexpresarse ocasionando daño intrínseco en los tejidos celulares (Stawowczyk *et al.*, 2011).

IFIT 1 e IFIT2 se ha propuesto interactúan directamente con STING (ISG) (Li *et al.*, 2009). El cual recluta TBK1 (vía alterna además de la de IFIT3) y propaga la fosforilación para finalmente activar IRF3, NF- κ B y la producción de IFN junto con MAVS (Ishikawa y Barber, 2008; Paludan y Bowie, 2013), en este caso la sobreexpresión de IFIT1 en células HEK resulta en decremento de activación de IRF3 e IFN β . Aquí IFIT1 se describe como disruptor de la interacción de STING con MAVS o TBK1 (Li *et al.*, 2009).

Con el tratamiento exógeno de IFN en células MDCK que no son infectadas con PVC, se obtuvieron niveles basales IFIT1 e IFIT3 que puede ser debido a que estas proteínas antivirales inician su expresión solo ante el estímulo viral y no solo están relacionadas con la secreción de IFN, es decir se necesita de ambos estímulos: la secreción de IFN β y la entrada de PVC para desencadenar la expresión de proteínas antivirales IFIT1 e IFIT3.

Nuestros resultados muestran que la secreción temprana y mantenida de IFN β permite la expresión prematura de proteínas antivirales IFIT1 e IFIT3; logrando que los niveles de RNAm de estas proteínas se eleven desde la fase temprana e incrementen en la fase tardía de infección, lo que refleja en células tratadas con IFN exógeno la disminución en el número de copias genómicas de VP2 y NS1 en ambas fases de infección. Es decir, se disminuye la replicación de PVC al activar tempranamente tanto la secreción de IFN β , como de IFIT1 e IFIT3. Esto nos demuestra que una activación temprana del sistema inmune innato desencadena una secreción de proteínas antivirales que ayudan a la célula hospedera a hacer frente a la infección viral por PVC.

Con todos estos resultados se demuestra que existe una modulación molecular de la respuesta inmune ante una infección viral. El control es direccionado por el IFN β que es el encargado de iniciar la expresión de proteínas antivirales que son las encargadas de



disminuir la replicación viral y eliminar las partículas virales, permitiendo que las células hospederas logren sobrevivir.

El virus por otro lado parece logra momentáneamente mantener inactiva la respuesta antiviral al acoplarse tempranamente con la membrana mitocondrial, estableciendo una despolarización membranar lo que desacopla proteínas asociadas a la mitocondria que son reguladoras de la señalización de secreción de IFN β . Existe una correlación entre el número de partículas virales de PVC, y el número de transcritos de RNAm de IFN β , en una fase temprana; existe además una asociación directa del PVC con la mitocondria y esta incrementa en la fase tardía donde activan probablemente mecanismos apoptóticos donde la célula ya es incapaz de hacer frente a la infección viral (Zhou *et al.*, 2011).

Es necesario apreciar a detalle la complejidad de las interacciones y uniones que pueden explicar las distintas funciones de las proteínas IFIT en el control de la patogénesis viral y, posiblemente, con esto se minimice el daño mediado por el sistema inmune al hospedero.



Capítulo VI

CONCLUSIONES

- NS1 se sobreexpresa durante la fase temprana lo que sugiere que es la primer proteína que se transcribe durante el inicio de la replicación de PVC. Así mismo la sobreexpresión de VP2 durante la fase tardía demuestra que se comienza a presentar el ensamblado de viriones de PVC.
- Hay una expresión de IFN β basal en las células sin infectar y en células tratadas con IFN exógeno no mostrando una diferencia significativa lo que sugiere que se necesita un estímulo diferente para el inicio de una expresión mayor de IFN β .
- El IFN β muestra un aumento significativo en su expresión en células tratadas con IFN exógeno y en células infectadas con PVC durante la fase tardía mostrando diferencias significativas entre ambos tratamientos durante la misma fase, dicha sobreexpresión puede ser consecuencia de la infección por PVC al activar la cascada de señalización induciendo una secreción mayor de IFN β .
- El tratamiento con IFN β exógeno estimula la secreción temprana de las proteínas IFIT1 e IFIT3 (día 8) e incrementa en la fase tardía (día 11) lo que ayuda a la disminución de copias genómicas de PVC desde la fase temprana.
- La secreción de IFN β inicia la expresión de IFIT1 e IFIT3 cuya finalidad es disminuir la replicación viral al reducir la expresión de las proteínas NS1 y VP2 en células tratadas con IFN exógeno. Demostrando la actividad antiviral durante la replicación de PVC.
- La expresión de IFIT1 inicia en la fase temprana alcanzando su máximo nivel en la fase tardía, tanto en células tratadas con IFN exógeno e infectadas con PVC y células solo con PVC. Sugiriendo la activación desde una fase temprana de la cascada de activación de IFN lo que lleva a la expresión de proteínas IFIT.
- La proteína IFIT3 tiene una sobreexpresión tanto en la fase temprana como en la tardía en células tratadas con IFN exógeno e infectadas con PVC, dicha sobreexpresión es menor que en células infectadas con PVC. Lo que demuestra que IFIT3 tiene un papel importante durante el control de la infección por PVC.



Capítulo VII

BIBLIOGRAFÍA

Aimee, E. y Craig, T. (2004). Death by desing: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 16(6):663-9.

Akira, S. y Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4(7):499–511.

Alcami, A. y Ulrich, K. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today.* 21(9):447-455.

Allison, A., Kohler, D., Ortega, A., Hoover, E. y Grove, D. (2014). Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation it different carnivore species. *Plos Pathog.* 10(11) e1004475. doi: 10.1371/ journal. ppat. 1004475.

Andrejeva, J., Childs, K., Young, D., Carlos, T., Stock, N., Goodbourn, S. y Randall, R. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(49):17264-17269.

Appel, J., Scott, F. y Carmichael, L. (1979). Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec.* 105(8):156–159.

Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., y Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(18):7500–7505.

Arnoult, D., Soares, F., Tattoli, I., Castanier, C., Philpott, D.J., y Girardin, S. (2009). An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J. Cell Sci.* 122(17), 3161–3168.



Arnoult, D., Soares, F., Tattoli, I. y Girardin, E. (2011). Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep.* 12(9):901-910.

Attardi, G. y Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria, *Annu Rev Cell Biol.* 4:289–333.

Berchtold, S. (2008). Forced IFIT-2 expression represses LPS induced TNF-alpha expression at posttranscriptional levels. *BMC Immunol.* 24; 9:75.

Bluyssen, H. (1994). Structure, chromosome localization, and regulation of expression of the interferon-regulated mouse *lfi54/lfi56* gene family. *Genomics.* 24(1):137–148.

Bonham, K., Orzalli, M., Hayashi, K., Wolf, A., Glanemann, C., Wenninger, W., Iwasaki, A., Knipe, D. y Kagan, J. (2014). A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of Toll-like receptor signal transduction. *Cell.* 156(4):705–716.

Carmichael, L., Joubert, J. y Pollock, R. (1980). Haemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res.* 41(5):784–791.

Castanier, C., Garcin, D., Vazquez, A. y Arnoult, D. (2010). Mitochondrial dynamics regulate the RIG I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep.* 11(2):133–138.

Cater, J. y Pintel, D. (1992). The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol.* 73(7):1839–1843.

Chan, D. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 125(7):1241–1252.

Chia-Yi, Y., Ruei-Lin, C., Tsung-Hsien, C., Ching-Len, L. y Yi-ing, L. (2010). The Interferon Stimulator Mitochondrial antiviral signaling protein facilitates cell death by disrupting the mitochondrial membrane potential and by activating caspases. *J Virol.* 84(5):2421-2431.



- Cotmore, S. y Tattersall, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res.* 33:91–174.
- Cureton, D., Harbison, C., Cocucci, E., Parrish, C. y Kirchhause, T. (2012). Limited transferring receptor clustering allows rapid diffusion of canine parvovirus into clathrin endocytic structures. *J Virol.* 86(9):5330-5340.
- Danial, N. y Korsmeyer. (2004). Cell death: critical control points. *Cell.* 116(2):205-219.
- De Veer MJ, Sim H, Whisstock JC, Devenish RJ, Ralph SJ. (1998). IFI60/ISG60/IFIT4, a new member of the human IFI54/IFIT2 family of interferon-stimulated genes. *Genomics.* 54(2):267–277.
- Decaro, N. y Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus- A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbio.* 155(1):1-12. CHECAR
- Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 95(26):15623–15628.
- Desagher, S. y Martinou, J. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10(9):369–377.
- Diamond, M. y Farzan, M. (2012). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol.* 13(1):46-57.
- Dixit, E., Boulant, S., Zhanh, Y., Lee, A., Odendall, C., Shum, B., Hacohen, N., Chen, Z., Whelan, S., Fransen, M., Nibert, M., Superti-Furga, G. y Kagan, J. (2010). Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell.* 141(4):668–681.
- Dostert, C. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 320(5876):674-677.
- Ekert, P. y Vaux, D. (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol.* 17(6):626–630.



Everett, H. y McFadden, G. (1999). Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 7(4): 160-165.

Fensterl, V. y Sen, G. (2011). The ISG56/IFIT1 Gene Family. *J Interferon Cytokine Res.*; 31(1):71–78.

Flint, J., Racaniello, V., Rall, G. y Skalka, A. (2004). Principles of Virology. Cuarta Edición. ASM.

Fritz, H., Ferrero, R., Philpott, D. y Girardin, S. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol.* 7(12):1250–1257.

Gack, M., Shin, Y., Joo, C., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., y Jung, J.U. (2007). TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 446(7138): 916–920.

Galluzzi, L., Kepp, O. y Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(12):780-788.

Garedew, A., Henderson, S. y Moncada, S. (2010). Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 17(10):1540–1550.

Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D. y Allen, H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature.* 386(6625):619-623.

Gilbert, L., Valilehto, O., Kirjavainen, S., Tikka, P.J., Mellett, M., Kapyla, P., Oker-Blom, C. y Vuento, M. (2005). Expression and subcellular targeting of canine parvovirus capsid proteins in baculovirus-transduced NLFK cells. *FEBS Letters.* 579(2):385–392.



- Goldstein, I., Marcel, V., Olivier, M., Oren, M., Rotter, V. y Hainaut, P. (2011). Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Ther.* 18(1):2–11.
- Goodman, L., Lyi, S., Johnson, N., Cifuentes, J. y Hafenstein, S. (2010). Binding site on the transferrin receptor for the parvovirus capsid and effects of altered affinity on cell uptake and infection. *J Virol.* 84(10):4969–4978.
- Green, D., Galluzzi, L. y Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science.* 333(6046):1109–1112.
- Gunter, T., Yule, D., Gunter, K., Eliseev, R. y Salter, J. (2004). Calcium and mitochondria, *FEBS Lett.* 567(1):96–102.
- Gupta, S., Sahoo, A., Rosh, N., Gandham, R., Saxena, L., Singh, A., Harish, D. y Tiwari, A. (2016). Canine parvovirus NS1 induced apoptosis involves mitochondria, accumulation of reactive oxygen species and activation of caspases. *Virus Res.* 213:46-61.
- Hinnebusch, A. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci.* 31(10):553–562.
- Horner, S., Liu, H., Park, H., Briley, J. y Gale, M. (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 108(35):14590–14595.
- Hornig, T., Barton, G., Flavell, R. y Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* 420(6913):329–333.
- Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jian, Q. y Chen, Z. (2011). MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell.* 146(3):448–461.
- Hristov, G., Kramer, M., Li, J., El-Andaloussi, N., Mora, R., Daeffler, L., Zentgraf, H., Rommelaere, J. y Marchini, A. (2010). Through its nonstructural protein NS1, parvovirus

H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species. *J Virol.* 84(12):5909–5922.

Ihalainen, T., Niskanen, E., Jylhävä, J., Paloheimo, O., Dross, N., Smolander, H., Langowski, J., Timonen, J. y Vihinen-Ranta, M. (2009). Parvovirus induced alterations in nuclear architecture and dynamics. *Plos One.* 4(6): e5948-e5948.

Iseki, H., Shimizukawa, R., Sugiyama, F., Kunita, S., Iwama, A., Onodera, M., Nakauchi, H. y Yagami, K. (2005). Parvovirus nonstructural proteins induce an epigenetic modification through histone acetylation in host genes and revert tumor malignancy to benignancy. *J Virol.* 79(14):8886–8893.

Ishikawa, H. y Barber, G. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature.* 455(7213):674-678.

Ito Y, Montagnier L. Heterogeneity of the sensitivity of vesicular stomatitis virus to interferons. 1977. *Infect. Immun.* 18(1):23-27.

Iyer, S., He, Q., Janczy, J., Elliot, E., Zhong, Z., Olivier, A., Sadler, J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S., Naussef, W. y Cassel, Suzanne. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39(2):311–323.

Jacotot, E., Ravvagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K., Vieira, H., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J., Irinopoulou, T., Daugas, E., Susin, S., Cointe, D., Xie, Z., Reed, J., Roques, B., y Kroemer, G. (2000). The HiV-1 viral protein rinduces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med.* 191(1):33–46.

Kaelber, J., Demogines, A., Harbison, C., Allison, A., Goodman, L., Ortega, A., Sawyer, S. y Parrish, C. (2012). Evolutionary reconstructions of the transferrin receptor of caniforms supports canine parvovirus being a re-emerged and not a novel pathogen in dogs. *Plos Pathog.* 8(5): e1002666.



Kagan, J., Giri, V. y Wu, H. (2014). SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 14(12):821-826.

Kalvakolanu, D.V. (1999). Virus interception of cytokine-regulated pathways. *Trends Microbiol.* 7(4): 166-171.

Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O. y Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-in antiviral response. *Immunity.* 23(1):19–28.

Kawai, T., y Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 7(2):131–137.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K., Takeuchi, D. y Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6(10):981-988.

Kerr, J., Wyllie, A. y Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4):239–257.

Koshida, T. (2013). Mitochondrial-mediated antiviral immunity. *Biochim Biophys Acta.* 1833(1):225-232.

Koshihara, T., Yasukawa, K., Yanagi, Y. y Kawabata, S. (2011). Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci Signal.* 1;4(158): ra7.

Krawczyk, C., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R., Cross, J., Jung, E., Thompson, C., Jones, R y Pearce, E. (2010). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 115(23):4742–4749.

Kumar, H., Kawai, T. y Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30(1):16–34.



- Kvansakul, M., Van Delft, M., Lee, E., Gulbis, J., Fairlie, W., Huang, D. y Colman, P. (2007). A structural viral mimic of prosurvival Bcl-2: a pivotal role for sequestering proapoptotic Bax and Bak. *Mol Cell*. 25(6):933–942.
- Labbe, K. y Saleh, M. (2008). Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ*.15(9):1339-1349.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. y Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*.14(1):44-55.
- Lawrence, C., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R. y Borhani, D. (1999). Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science*. 286(5440):779–782.
- Lee, M. y Kim, Y. (2007). Signaling pathways downstream of pattern recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem*.76:447-480.
- Leo, S., Bianchi, K., Brini, M. y Rizzuto, R. (2005). Mitochondrial calcium signalling in cell death, *FEBS J*. 272(16):4013–4022.
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J. (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 80(3):401-411.
- Li, Y., Li, C., Xue, P., Zhong, B., Mao, A. (2009). ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(19):7945–50.
- Lin, S., Lo, Y. y Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 465(7300):885–890.
- Liu, X., Chen, W., Wei, Bo., Fei, Y. y Wang, C. (2011). IFN-induced TPR protein IFIT3 potentiates antiviral signaling by bridging MAVS and TBK1. *J Immunol*. 187(5):2559-2568.



- Livak, K. y Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Lovlee, S., Kumar, G., Saxena, S., Chaturvedi, U., Sahoo, A., Sing, L., Santra, L., Palia, S., Desai, G. y Tiwari, A. (2013). Apoptosis induced by NS1 gene of Canine Parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent. *Virus Res*. 173(2):426-430.
- Luck, A. y Mason, A. (2012). Transferrin-mediated cellular iron delivery. *Curr Top Membr*. 69:3–35.
- Marchini, A., Bonifati, S., Scott, E. M., Angelova, A. L., & Rommelaere, J. (2015). Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Virology*. 12(6):1-16.
- Mattei, L., Cotmore, S. y Tattersall, P. (2013). Parvovirus evades interferon-dependent viral control in primary mouse embryonic fibroblast. *Virology*. 442(1):20-27.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449(7164):819-826.
- Meunier, C., Cooper, B., Appel, M. y Slauson, D. (1985). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet Pathol*. 22(1):60–71.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. y Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 437(7062):1167-1172.
- Meylan, E. y Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol. Cell*. 22(5):561-569.
- Michallet, M., Meylan, E., Ermolaeva, M., Vazquez, J., Rebsamen, M., Curran, J., Poeck, H., Bscheider, M., Hartmann, G. y Konig, M. (2008). TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity*. 28(5):651–661.

Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T. y Akira, S. (2013). Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 14(5):454–460.

Moore, C., Bergstralh, D., Duncan, J., Lei, Y., Morrison, T., Zimmermann, A., Accavitti-Loper, M., Madden, V., Sun, L. Ye, Z., Lich, J., Heise, M., Chen, Z. y Ting, J. (2008). NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature.* 451(7178):573-577.

Moore, C. y Ting, J. (2008). Regulation of mitochondrial antiviral signaling pathways. *Immunity.* 28(6):735-739.

Morita, S., Shimanouchi, T., Sasaki, M., Umakoshi, H. y Kuboi, R. (2003). Detection of a heat stress-mediated interaction between protein and phospholipid membrane using dielectric measurement. *J Bios Bioengi.* 95(3):252–256.

Motshwene, P., Moncrieffe, M., Grossmann, J., Kao, C., Ayalur, M., Sandercock, A., Robinson, C., Latz, E. y Gay, N. (2009). An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J Biol Chem* 284(37):25404–25411.

Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. (2009). Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *J Mol Cell Cardiol.* 46(6):781–788.

Muzyczka, N. y Berns, K. (2001). Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M, Howley, P.M (Eds.), *Fields Virology* 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 2327–2359.

Nagai, T., Abe, A. y Sasakawa, C. (2005). Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J Biol Chem.* 280(4):2998–3011.

Naik, E. y Dixit, V. (2011) Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med.* 208(3):417–420.



Nykky, J., Tuusa, J., Kirjavainen, S., Vuento, M. y Gilbert, L. (2010) Mechanisms of cell death in canine parvovirus-infected cells provide intuitive insights to developing nanotools for medicine. *Int J Nanomedicine*. 9(5):417–428.

Nykky, J., Vuento, M., Gilbert, L. (2014). Role of Mitochondria in Parvovirus Pathology. *Plos One*. 9(1):1-10.

Nuesch, J. y Rommelaere, J. (2007). A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(30):12482–12487.

Ohta, A. y Nishiyama, Y. (2011). Mitochondria and viruses. *Mitochondrion*. 11(1):1-12.

Okabe, Y., Sano, T., and Nagata, S. (2009). Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent. *Nature* 460, 520–524.

Onoguchi, K., Onomoto, K., Takamatsu, S., Jogi, M., Takemura, A., Morimoto, S., Julkunen, I., Namiki, H., Yoneyama, M. y Fujita, T. (2010). Virus-infection or 5'pppRNA activates antiviral signal through redistribution of I κ B-1 mediated by MyD88. *PLoS Pathog*. 6(7): e1001012.

Op De Beeck, A., Sobczak-Thepot, J., Sirma, H., Bourgain, F., Brechet, C. y CailletFauquet, P. (2001). NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). *J Virol*. 75(22):11071–11078.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(7):552–565.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. y Seya, T. (2003a). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat Immunol*. 4(2):161–167.

Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. y Seya, T. (2003b). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- β . *J Biol Chem*. 278(50):49751–49762.



Paludan, S. y Bowie, A. (2013). Immune sensing of DNA. *Immunity*. 38(5):870-80.

Parker, J. y Parrish, C. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol*. 74(4):1919-1930.

Parrish, C. (1994). The emergence and evolution of canine parvovirus. An example of recent host range mutation. *Sem Virol*. 5(2):121-132.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., y Reis, S. (2009). Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol*. 83(20):10761–10769.

Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C., Gónna, M., Baumann, C., Burkard, T., Bürckstümmer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K., Rüllicke, T., Weber, F., Colinge, J., Müller, M. y Superti-Furga, G. (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat Immunol*. 12(7):624-30.

Pollock, R. (1982). Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet*. 72(2):103–119.

Poole, B., Zhou, J., Grote, A., Schiffenbauer, A. y Naides, S. (2006). Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. *J Virol*. 80(8):4114–4121.

Qiu, J., Yoto, Y., Tullis, G. y Pintel, D. (2006). Parvovirus RNA processing strategies. In “the Parvoviruses” (J. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish, eds.), Chap. 18, pp. 253–274. Hodder Arnold, London.

Rasola, A. y Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*. 12(5):815-833.

Rebsamen, M., Meylan, E., Curran, J. y Tschopp, J. (2008). The antiviral adaptor proteins Cardif and Trif are processed and inactivated by caspases. *Cell Death Differ*. 15(11):1804-1811.



- Rintahaka, J., Wiik, D., Kovanen, P., Alenius, H. y Matikainen, S. (2008). Cytosolic antiviral RNA recognition pathway activates caspases 1 and 3. *J. Immunol.* 180(3):1749-1757.
- Rutter, G. y Rizzuto, R. (2000). Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection, *Trends Biochem Sci.* 25(5):215–221.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L., Van Gurp, M., Van Loo, G. y Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23(16):2861–2874.
- Saffran, H., Pare, J., Corcoran, J., Weller, S. y Smiley, J. (2007). Herpes simplex virus eliminates host mitochondrial DNA. *EMBO Rep.* 8(2): 188–193.
- Sarkar, S. y Sen, G. (2004). Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol Ther.* 103(3):245–259.
- Schneider, W., Dittmann, M. y Rice, C. (2014). Interferon-Stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 32:513-545.
- Schoggins, J. (2014). Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol.* 0:40-46.
- Scott, I. y Norris, K. (2008). The mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS, is cleaved during apoptosis. *Biochem. Biophys Res Commun.* 375(1):101-106.
- Sen, G. y Sarkar, S. (2007). The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 316:233–250.
- Seth, R., Sun, L., Ea, C. y Chen, Z. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell.* 122(5):669-682.



Soucy-Faulkner, A., Mukawera, E., Fink, K., Martel, A., Jouan, I., Nzengue, Y., Lamarre, D., Vande Velde, C. y Grandvaux, N. (2010). Requirement of noX2 and reactive oxygen species for efficient RIG I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog.* 6(6): e1000930.

Stawowczyk M, Van Scoy S, Kumar KP, Reich NC. (2011). The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J Biol Chem.* 286(9):7257–66.

Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M., Wang, Z. y Germain, R. (2013). The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell.* 153(2):348–361.

Takeuchi, O. y Akira, S. (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev.* 220:214-224.

Takeuchi, O. y Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 227(1):75–86.

Takeuchi, O. y Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140(6):805–820.

Tattersall, P., Bergoin, M., Bloom, M., Brown, K., Linden, M., Muzyczka, N., Parrish, C. y Tijssen, P. (2005). Parvoviridae. In “Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV” (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball. Elsevier/Academic Press, London. pp. 353–369.

Terenzi F, Saikia P, Sen GC. 2008. Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *Embo J.* 27(24):3311–3321.

Tortorella, D. (2000). Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 18:861-926.

Turner, P. y Moyer, R. (1998). Control of apoptosis by poxviruses. *Sem Virol.* 8(6):453-469.



- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Mäkinen, P., Kakkola, L., Marjomäki, V. y Vuento, M. (1998). Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol.* 72(1):802-806.
- Vladimer, G., Gónna, M. y Superti-Furga, G. (2014). IFITs: emerging roles as key anti-viral proteins. *Front Immunol.* 5(94):1-6.
- Wang, D., Yuan, W., Davis, I. y Parrish, C. (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology.* 240(2):273–281.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15(22):2922–2933.
- Wasilenko, S., Stewart, T., Meyers, A. y Barry, M. (2003). Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(24):14345–14350.
- Werd, N., Samarajiwa, S. y Hertzog, P. (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem.* 282(28):20053-20057.
- West, A., Shadel, G. y Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses, *Nat Rev Immunol.* 11(6):389–402.
- Wu, B., Peisley, A., Tetrault, D., Li, Z., Egelman, E., Magor, K., Walz, T., Penczek, P. y Hur, S. (2014). Molecular imprinting as a signal activation mechanism of the viral RNA sensor RIG-I. *Mol Cell.* 55(4):511–523.
- Wu, Y., Vendome, J., Shapiro, L., Ben-Shaul, A. y Honig, B. (2011). Transforming binding affinities from three dimensions to two with application to cadherin clustering. *Nature.* 475(7357):510–513.
- Xu, L., Xiao, N., Liu, F., Ren, H. y GU, J. (2009). Inhibition of RIG-I and MDA5-dependent antiviral response by gc1qr at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(5):1530–1535.
- Xu, L., Wang, Y., Han, K., Li, L., Chai, Z. y Shu, B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell.* 19(6):727-740.



Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. y Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301(5633):640–643.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. y Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*. 4(11):1144–1150.

Yoneyama, M. y Fujita, T. (2008). Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity*. 29(2):178-181.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. y Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol*. 5(7):730-737.

Zeng, W., Xu, M., Liu, S., Sun, I. y Chen, Z. (2009). Key role of ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of irF3. *Mol Cell*. 36(2):315–325.

Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P. y Shu, H. (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*. 29(4):538-550.

Zhou, R., Yazdi, A., Menu, P. y Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 469(7329):221-225.

7.1. PAGINAS WEB CONSULTADAS

<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> (consultada 11-marzo-2017)

<http://viralzone.expasy.org/> (consultada 12-marzo-2017)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (consultada 12-marzo-2017)

<https://talk.ictvonline.org/> ICTV 2016 (consultada 7. abril.2017)



ANEXOS



ANEXO 1

EXTRACCIÓN ADN PLASMÍDICO

LISIS ALCALINA

1. Sembrar el plásmido en medio LB y se incuba por 18-24 hrs en agitación a 37°C.
2. Transferir medio en tubo de 15 mL. Centrifugar a 10000 rpm/10 min.
3. Retirar sobrenadante y recuperar pastilla en tubos de 2 mL estériles.
4. Centrifugar tubos a 10000 rpm/10 min. Retirar sobrenadante.
5. Resuspender pastilla en 100 mL de solución de lisis I (Glucosa 50 mM, TRIS/HCL 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 a 4°C). Homogeneizar mezcla.
6. Agregar 200 µL de solución II fresca (NaOH 0.2 N, SDS 1%). Mezclar por inversión y poner en hielo 5 minutos.
7. Agregar 150 µL de solución III (Acetato de potasio 5M-60mL-, ácido acético glacial- 11.5 mL- y H₂O-28.5 mL-, a 4°C)
8. Mezclar bien y poner en hielo 5 minutos.
9. Centrifugar a 4°C a 10000 rpm/2 minutos
10. Transferir sobrenadante a un tubo de 1.5 mL
11. Agregar fenolcloroformo 1:1
12. Homogeneizar mezcla y centrifugar a 12000 rpm/2 minutos a 4°C. Transferir sobrenadante a tubo de 1.5 mL
13. Agregar 2:1 de etanol al 100%. Homogeneizar mezcla y centrifugar a 12000 rpm/12 minutos a 4°C. Remover sobrenadante
14. Secar pastilla a temperatura ambiente. Limpiar pastilla con 1 mL de etanol al 70%. Retirar sobrenadante. Dejar secar pastilla
15. Agregar a la pastilla de 15-20 µL de TE (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM pH 8)
16. Agregar 2 µL de RNasa y poner a 37°C por 40 minutos
17. Hacer gel de agarosa para verificar calidad de extracción



ANEXO 2

PURIFICACIÓN ADN DE PRODUCTOS PCR SILICA/ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA

1. Poner reacción de PCR a 56°C, para evaporar la mitad del volumen (alrededor de 1 hora)
2. Pasar producto de PCR a tubo de 0.5 mL estéril
3. Agregar 100 µL de SLT (isotiocianato de guanidina 5 M, TRIS/HCL 100 mM pH 6.4, EDTA 50 mM, pH 8 y Tritón 100X 2.5%)
4. Homogeneizar mezcla 15 segundos.
5. Agregar 15 µL de silica, mezclar 15 segundos. Dejar reposar 5-10 minutos a temperatura ambiente
6. Centrifugar a 13000 rpm/45 segundos
7. Retirar sobrenadante (guardar no desechar)
8. A pastilla de silica agregar 100 µL de etanol al 70% (4°C). Homogeneizar mezcla
9. Centrifugar a 13000 rpm/45 segundos, desechar sobrenadante sin remover pastilla de silica
10. Agregar 100 µL de acetona fría. Homogeneizar 15 segundos y centrifugar a 13000 rpm/45 segundos. Desechar sobrenadante
11. Dejar secar pastilla hasta evaporar toda la acetona restante
12. Resuspender pastilla de silica en 20 µL de TE (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM pH8)
13. Homogeneizar pastilla 15 segundos
14. Poner tubo a 56°C durante 10 minutos. Centrifugar a 13000 rpm por 45 segundos
15. Recuperar sobrenadante en tubo de 0.5 mL estéril (ADN purificado)
16. Congelar hasta su uso.
17. Hacer gel de agarosa para verificar calidad de purificación



ANEXO 3

EXTRACCIÓN ADN SILICA-TIOCIANATO DE GUANIDINA

1. Centrifugar tubos de muestras de los ensayos de infección a 13300 rpm/15 minutos
2. Agregar 450 µL de SLT (isotiocianato de guanidina 5 M, TRIS/HCL 100 mM pH 6.4, EDTA 50 mM pH 8 y Tritón 100X 2.5%)
3. Homogeneizar mezcla por 5 a 10 minutos
4. Agregar 20 a 40 µL de silica. Homogeneizar por 15 segundos. Dejar reposar durante 10 minutos
5. Homogeneizar por 15 segundos y centrifugar a 13000 rpm/15 segundos
6. Retirar sobrenadante y guardar
7. Agregar 500 µL de SLS (isotiocianato de guanidina 5 M, TRIS/HCL 100 mM pH 6.4)
8. Homogeneizar y dejar reposar 10 minutos. Centrifugar a 13000 rpm/15 segundos
9. Retirar sobrenadante y guardar
10. Agregar 1 mL de etanol al 70% frío
11. Homogeneizar y dejar reposar por 10 minutos. Centrifugar a 13000 rpm/15 segundos. Retirar sobrenadante
12. Agregar 1 mL de acetona fría
13. Homogeneizar y dejar reposar 10 minutos
14. Centrifugar a 13000 rpm/15 segundos
15. Retirar sobrenadante y poner a secar pastilla
16. Agregar a pastilla de silica de 15 a 20 µL de TE (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM pH 8)
17. Homogenizar pastilla y TE
18. Poner a 56°C 10 minutos
19. Homogeneizar 15 segundos y centrifugar a 13000 rpm/2 minutos
20. Recuperar sobrenadante y transferir a tubo de 0.5 mL
21. Hacer gel de agarosa para verificar calidad de extracción.



ANEXO 4

EXTRACCIÓN RNA TRIZOL

1. A cada tubo de los ensayos realizados agregar 1 mL de TRIZOL
2. Incubar a 4°C por 5 minutos
3. Agregar 200 µL de cloroformo y homogeneizar 15 segundos. Incubar a 4°C por 2 minutos
4. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos
5. Transferir la fase acuosa a un tubo estéril de 1.5 mL y se agrega fenolcloroformo relación 1:1
6. Homogeneizar durante 30 segundos y centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos
7. Recuperar sobrenadante y agregar 500 µL de isopropanol frío
8. Homogeneizar e incubar a 4°C durante 10 minutos
9. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos
10. Retirar sobrenadante y desechar
11. Lavar pastilla con 1 mL de etanol al 70%
12. Centrifugar a 7500 rpm por 6 minutos
13. Retirar y desechar sobrenadante
14. Poner pastilla a secar
15. Resuspender pastilla en 20 µL de agua DEPC 1%
16. Para verificar calidad de extracción se realiza una electroforesis



GLOSARIO

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
AIM2	Ausente en Melanoma 2
AKT	Homologo celular de v-AKT
ALR	receptor tipo AIM2
ASC	Proteína asociada a apoptosis que contiene CARD
ATG	Gen específico de autofagia
AZI2	5-inducido por azacitidina 2
BAK	antagonista BCL2
BAX	BCL2 asociado a proteína X
BCL2	Celulas B leucemia/linfoma 2
C1QBP	Complemento componente 1q, subcomponente de union a proteina
DAMP	Patron molecular asociado a daño
DDX3X	Dominio de muerte celular (Asp-Glu-Ala-Asp) 3-X
DEXH	(Asp-Glu-X-His) proteina 58
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte celular
ECSIT	Intermediario en vía de TOLL
FADD	Proteína dominio Fas asociado a muerte celular
FPR1	Receptor peptido formil 1
gC1q	Componente 1 complemento, q subcomponente unión a proteina
IFN	Interferon
IFNγ	Interferon gamma
IKK	Kinasa I κ B
IL-10	Interleucina 10
IRAK 1	Receptor asociado a kinasa de IL-1
IRF	Factor regulador de Interferon
ITCH	Ubiquitin protein ligasa E3
MAM	Membrana asociada a mitocondria
MAVS	Sensor viral asociado a mitocondria
MDA5	diferenciación de melanoma asociado a proteina 5
MFN	Mitofusina
MFN1	Mitofusina 1
MFN2	Mitofusina 2
MyD88	Gen 88 de respuesta primaria a diferenciación mieloide
NAP1	Protein kinasa 1 activador de NF- κ B
NEMO	Modificador esencial NF- κ B
NF-κB	Factor nuclear κ B
NLRX1	Receptor tipo NOD de la familia X1 (NLR)
NLR	Receptor NOD-like



NOX2	NADH oxidasa 2
PAMP	Patron molecular asociado a patógeno
PCBP	Poli(rC)- unión a proteína
PIDD	Proteína inducible de P53
PI3K	Fosfoinositid 3-kinasa
PLK1	Kinasa 1 tipo polo
Poly(I:C)	Ácido polinosine-policitidílico
PSMA7	Proteosoma subunidad, α tipo 7
RAIDD	Asociado a RIP ICH/CED3 dominio de muerte celular
RIG I	Ácido retinoico inducible gen I
RIPK1	Receptor-componente protein kinasa 1
RLR	Receptor tipo RIG
RNF	Receptor tipo anillo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SMOC	Centro de organización supramolecular
STING	Estimulador de genes de interferon
T1CAM	Dominio TIR contiene molecula adaptadora 1
TANK	Miembro familia TRAF asociado a activador de NF- κ B
TBK1	Kinasa 1 de unión a TANK
TIRAP	Dominio Toll/IL-1R proteina adaptadora
TLR	Receptor tipo Toll
TOM70	Traslocasa de membrana mitocondrial subunidad de 70kDa
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNFR1
TRAF	Factor asociado a receptor TNF
TRIF	Dominio TIR conteniendo adaptador de inducción IFN- β
TUFM	Factor de elongación traduccional mitocondrial Tu
VDAC	Canal anionico dependiente de voltaje
WDR5	WD dominio de repetición de proteína 5 localizado cuando no hay unión con MAVS



Sub-expresión de IFN β y proteínas IFIT 1 e IFIT3 en células MDCK infectadas con Parvovirus canino

Reyes-Cruz, T. Méndez Olvera, E. y Martínez Gómez, D.

Correspondencia: Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, Departamento Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, México 04960. dmartin@correo.xoc.uam.mx

Para evaluar los mecanismos virales de infección llevados a cabo por Parvovirus, se infectaron células MDCK (células de riñón de perro) con una cepa de Parvovirus canino en periodos de 1 a 14 días. Durante este período de acuerdo al incremento en copias virales cuantificadas mediante q-PCR se estableció una fase temprana (día 8) y una fase tardía de infección (día 11). Se cuantificaron en ambas fases el número de transcritos de IFN β , IFIT1 e IFIT3 para establecer si existe relación entre la expresión de estas proteínas durante la activación de la respuesta inmune del hospedero ante la infección viral por Parvovirus canino. La diferencia en el número de transcritos de IFN β , IFIT1 e IFIT3 durante la fase temprana y tardía es estadísticamente diferente ($p < 0.001$), teniendo un incremento mayor en la fase tardía de IFIT1 e IFIT 3 lo que denota la activación del sistema inmune del hospedero ante la infección por Parvovirus canino. La expresión de las proteínas IFIT1 e IFIT3 está relacionada directamente con la producción de IFN β lo que se corrobora con el incremento gradual de dicha proteína desde la fase temprana. Mediante cuantificación por RT-qPCR, se estableció que la primer proteína expresada durante la fase temprana es NS1 (inicio de la replicación de PVC); así mismo, la sobreexpresión de VP2 durante la fase tardía muestra el comienzo del ensamblaje de viriones de PVC.

Parvovirus Canino pertenece a la familia Parvoviridae, son virus pequeños (alrededor de 5.2kb) no envueltos, de cadena sencilla de ADN (29, 33). Este gran grupo se divide en 2 subfamilias: Parvovirinae, que infectan vertebrados y Densovirinae que infecta insectos y otros artrópodos. Dentro de la subfamilia Parvovirinae se encuentra el género Parvovirus, que contiene a los virus: Parvovirus canino (PVC), Parvovirus porcino (PPV), Minute Virus del ratón (MVM), entre otros (2, 5, 9).

La infección por PVC canino se caracteriza por presentar un cuadro de gastroenteritis aguda (22, 25) además de miocarditis con una marcada leucopenia esta enfermedad está asociada a una alta tasa de morbilidad y mortalidad en perros jóvenes >90%. PVC es extremadamente resistente a fluctuaciones en la temperatura (19, 31) lo que le permite persistir en el ambiente por meses y posiblemente años (1, 11, 17). PVC fue reportado por primera vez en los Estados Unidos en 1978 (3, 7, 18) y dos años después tenía ya una distribución mundial. Se estima que un millón de perros son infectados anualmente en los Estados Unidos aun con el uso de vacunas (6, 10, 12). El PVC se aisló por primera vez *in vitro* en Brasil en 1988; en México en el año 1980 se realizaron los primeros trabajos describiendo casos de enteritis hemorrágica con títulos altos de anticuerpos (4, 12, 23), los cuáles se sugirió eran causados por PVC. (14, 41, 54).

PVC ha desarrollado varias estrategias de evasión de la respuesta inmune del hospedero (8, 24, 25, 38) las cuales facilitan su sobrevivencia y su proliferación, tales como señalización de genes como secreción de IFN β , que juega un rol importante en la inmunidad innata y modula la transcripción de proteínas antivirales IFIT (13, 37, 45). Para dilucidar los mecanismos por los cuales PVC modula la señalización de la respuesta inmune del hospedero en el presente trabajo se cuantificó la expresión de genes de la respuesta inmune en células infectadas con PVC, lo que permite entender la modulación inmunológica *in vitro* ante una infección viral por PVC

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa Parvovirus canino y plásmido PVCMAN. La cepa de virus utilizada fue purificada a partir de heces de perro. Como control positivo de PVC se utilizó un plásmido con un fragmento clonado de 1446pb de la proteína VP2. Se sembró en agar LB (Luria Bertani) con ampicilina 1 μ L (1000mg/2mL) y se incubó 24 horas a 37 $^{\circ}$ C; Posteriormente, se tomó una colonia y se sembró por 18 horas a 37 $^{\circ}$ C. Se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el protocolo de Lisis Alcalina (protocolo modificado de Birnboim-Doly, 1979 e Ish Horowicz-Burke, 1981). La pastilla de ADN obtenida se resuspendió en TE (TRIS 10nM, EDTA 1mM pH8). Se verificó calidad de la extracción mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro



de etidio; finalmente, se observó en un transiluminador (BIO-RAD Universal Hood II ®).

Se realizó PCR para amplificar un fragmento de 800pb de VP2 de PVCMAN. En un tubo estéril de PCR de 0.2mL, se agregaron 25µL de PCR Master Mix 2X, 2µL del iniciador pPVC F, 2µL del iniciador pPVC R, 1µL de ADN plasmídico y 20µL de agua libre de nucleasas. Los iniciadores a utilizados fueron: pPVC F 5'-AGAGTGGTTGTAAATAATTTGG-3' y pPVC R 5'-GCCTCAAAGAATAATATGG-3'. Con las siguientes condiciones: desnaturalización 1min a 95°C, alineación 1 min a 50°C y elongación 1 min a 72°C por 35 ciclos (Termo MJ mini BIORAD ®).

Cultivo y conteo células MDCK. Para hacer las infecciones de PVC *in vitro* se utilizaron células MDCK (Madin-Darby canine kidney). Los viales de células guardados en congelación a -72°C fueron descongelados y las células se colocaron en tubos de 15mL estériles con 5mL de MEM con SFB 10%; el tubo se centrifugó a 800rpm por 5 minutos; se retiró el sobrenadante y se agregó 1mL de MEM con SFB10% fresco, la pastilla se homogeneizó para colocarlas en botellas de cultivo celular. Las células se incubaron durante 1 a 5 días a 37°C en botellas de cultivo de 25mL (12.5cm²) y 50mL (25cm²) (tissue culture flask, Jet Biofil ®), se les agregó de 3 a 5mL de MEM (Minimum Essential Medium, Gibco®) adicionado con Suero Fetal Bovino 10% (SFB), 25 a 50µL HEPES 1M (regulador pH) y 50 a 100µL de A/A (ampicilina G, estreptomina y anfotericina B, Hyclone ®).

Las células al formar una monocapa del 100% se desprendieron con 8mL de Tripsina 0.05 M filtrada y estéril, se colocó en un tubo de 15mL estéril, se agregaron 5mL de MEM con SFB 10% y se centrifugó a 800rpm durante 5 minutos; posteriormente, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1mL de MEM con 10%SFB. Para el conteo celular se tomaron 50µL de las células desprendidas y se colocaron en un tubo de 0.5mL estéril se adicionaron 50µL del colorante Azul de Trypan al 0.4% (Sigma®); la mezcla se homogeneizó dejándola reposar durante 8 minutos; con la ayuda de un hemocitómetro (0.100MM) se procedió a estimar el número de células por mililitro de medio, se utilizó un microscopio de objetivos invertidos (Velab^{MR}) (Ecuación 1).

Ecuación 1

número de células por mL =
promedio(4 cuadrantes) x Factor de dilución (2) x 10⁴

Cultivo PVC *in vitro*. En un tubo de 15mL estéril se colocaron MEM con SFB 10%, 100 000 células MDCK previamente cuantificadas con el hemocitómetro y 200-400µL del inóculo viral de la cepa de PVC. El tubo se puso a incubar a 37°C por 2 horas, para permitir el

contacto directo del virus con las células. Pasadas las 2 horas el inóculo contenido en el tubo de 15 mL se colocó en una botella de 25mL (12.5cm²) (tissue culture flask, Jet Biofil ®), se adicionaron 2mL de MEM con SFB 10%, 25µL de HEPES 1M y 50µL de A/A. Las botellas se mantuvieron en incubación a 37°C de 1 a 5 días. Pasado el tiempo de infección viral se retiró el sobrenadante y se guardó en un tubo de 15mL estéril en congelación a -4°C. Posteriormente se realizó la extracción de ADN y q-PCR para determinar el número de copias genómicas de PVC (VP2 y NS1), estos inóculos cuantificados fueron utilizados para los posteriores ensayos de infección.

Curva de replicación PVC infección *in vitro*. Para construir una curva de replicación viral se hicieron ensayos de infección de células MDCK con PVC durante 14. En un tubo de 15mL estéril se colocaron MEM con SFB 10%, células MDCK (100 000 cels/mL) y 1x 10⁶ partículas virales de PVC cuantificadas previamente por q-PCR (MOI 100:1), las células ya infectadas se colocaron en una placa de cultivo de 6 pozos y/o 48 pozos (Corning costar®), en cada pozo se colocó 1mL del inóculo, se agregó a cada pozo 1mL de MEM con SFB 10%, 25µL de HEPES 1M y 50µL de A/A; la placa se incubó de 14 días. La infección viral se detuvo a diferentes días (cada 72 horas). Se retiró el sobrenadante de cada pozo (a los días 1, 3, 5, 8, 11 y 14) y se guardó en tubos estériles de 1.5mL. Las células que quedaron adheridas aun en el fondo de cada pozo se desprendieron con 500µL de Solución de Lisis Total (5M isotiocianato de guanidina, 100mM TRIS/HCL pH 6.4, 50mM EDTA pH 8, y 2.5% TRITON 100X), se recuperaron estos 500µL en un tubo estéril de 1.5mL y se guardaron a -4°C para extracción de ADN y cuantificación de copias genómicas por q-PCR. Se establece una fase aguda (día 8) y una fase crónica (día 11) de infección por PVC.

Ensayo de infección PVC *in vitro*: Fase aguda-Fase crónica. Se plantean diferentes tratamientos esto con el fin de establecer las relaciones e interacciones entre el número de copias genómicas de PVC y el número de transcritos de RNAm de IFNβ, IFIT1 e IFIT3. Los tratamientos fueron células MDCK sin infectar (control); células MDCK infectadas con PVC; células MDCK tratadas con IFN y células tratadas con IFN infectadas con PVC.

Control (Células MDCK sin infectar). En un tubo estéril de 15mL se colocaron células MDCK (100 000 cels/mL), MEM con SFB 10%; se tomó 3mL para cada botella y se incubó a 37°C. **Células MDCK infectadas con PVC.** En un tubo estéril de 15mL se colocaron células MDCK (100 000 cels/mL), MEM con SFB 10% y 1x10⁶ partículas virales de PVC. Se tomó 3mL



para cada botella y se incubó a 37°C. **Células MDCK tratadas con IFN exógeno.** En un tubo estéril de 15mL se colocaron células MDCK (100 000 cels/mL), MEM con SFB 10% e IFN (100 000U/μL); se tomó 3mL para cada botella y se incubó a 37°C. **Células MDCK tratadas con IFN exógeno infectadas con PVC.** En un tubo estéril de 15mL se colocaron células MDCK (100 000 cels/mL), MEM con SFB 10% e IFN (100 000U/μL). Se tomó 3mL para cada botella y se incubó a 37°C. A cada botella se le agregaron 12.5μL HEPES 1M y 50μL de A/A. Se detuvo el ensayo al día 1, día 8 y día 11. Se recuperaron las células aun adheridas ya sea con SLT o TRIZOL y se guardaron a -4°C para extracción de ADN o RNA según sea el caso y la cuantificación de copias genómicas de PVC (NS1 y VP2), IFNβ, IFIT1 e IFIT3 por q-PCR y RT-PCR respectivamente.

Extracción ADN. Se realizó la extracción de ADN (para cuantificar el número de copias genómicas virales de PVC) de los ensayos de infección de la monocapa con silica/isotiocianato de guanidina (protocolo modificado de Clewley, 1993). La pastilla obtenida se resuspendió en TE (TRIS 10nM, EDTA 1mM pH8).

Extracción RNA. Se hizo extracción de RNA de los ensayos de infección fase aguda y crónica de los 3 tratamientos y el control. La extracción se realizó con TRIZOL® según las indicaciones del fabricante (Invitrogen). La pastilla obtenida de RNA se resuspendió en agua DEPC al 1% (Dietil dicarbonato).

Cuantificación número de copias de PVC y transcritos de NS1, VP2, IFNβ, IFIT1 e IFIT3. Para cuantificar el número de copias virales de PVC (NS1 y VP2); de IFNβ, IFIT 1 e IFIT3 se realizó un RT-qPCR. Se diseñaron iniciadores para NS1 (NS1-PVC F 5'-ATGTCTGGCAACCAGTATACTG-3' y NS1-PVC R 5'-CAGCAGACATCCTTTCCATT-3'), VP2 (PVCvp2 F 5'-TGAGGCGTCTACACAAGGG-3' y PVCvp2 R 5'-GATCACCATCTGCTGCTTGA-3'), IFNβ (IFNB-can F 5'-AGCAGCAGTTTGGAGTGCA-3' y IFNB-can R 5'-CTTCTGGAAGTGGCGTGA-3'); IFIT1 (IFIT.can F 5'-ATAGAGGCTGGCGACTACAG-3' y IFIT.can R 5'-TCCTTACAGCCAGTTTCTCC-3'); e IFIT3 (IFIT3.can F 5'-GGTCTACTATCACCTGGGCAGA-3' y IFIT3.can R 5'-TTTAGCCGTGTCCACCCTT-3'). Se utilizó como gen normalizador *gdph* (*gdph*Can F 5'-GGCTGAGAACGGGAACTT-3' y *gdph*Can R 5'-CCATTTGATGTTGGCGG-3'). Se hizo un alineamiento múltiple de secuencias en el programa DNAMAN (Lynnon Biosoft, 2015) a partir de secuencias reportadas de cánidos en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se realizó la síntesis de cDNA, de cada tubo de RNA extraído, se utilizó un kit (AMV first strand cDNA

síntesis kit de New England Biolabs) y se siguieron las indicaciones del fabricante.

Análisis Estadístico. Se estableció si existían diferencias significativas entre el número de copias genómicas de PVC a lo largo de un periodo de infección viral y entre tratamientos mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y para establecer las diferencias significativas entre las medias de cada tiempo de infección se realizó un análisis T-student ($p < 0.001$). Las diferencias entre los niveles de expresión de los genes NS1, VP2, IFNβ, IFIT1 e IFIT3 en las dos fases de infección se establecieron mediante un arreglo factorial para saber las diferencias entre cada factor (fase temprana, fase tardía). Se establecieron asociaciones y las diferencias entre fases de infección y la presencia o no de PVC en cada variable respuesta. Para todos los análisis se utilizaron los programas R, Rstudio, JMP, Origin 8 y el diseño de graficas se realizó con Adobe Illustrator 10.

RESULTADOS

CULTIVO Y AMPLIFICADO PLÁSMIDO PVC MAN

Las condiciones utilizadas en el PCR permitieron obtener un amplificado de la proteína VP2 de 800 pb. Este producto fue purificado con el protocolo de purificación con silica e isotiocianato de guanidina para utilizarse en los ensayos de cuantificación de viriones en células infectadas.

CULTIVO PVC *in vitro*

Se hicieron varias infecciones virales en células MDCK para así tener la mayor cantidad de virus replicante disponible. Posteriormente se realizaron ensayos de infección celular con PVC, y las células se mantuvieron en observación cada 24 horas para tener un registro de los efectos de daño celular debido a la infección viral. Se observó el comienzo de daños en el día 8 y para el día 11 y 14 estos fueron más evidentes, mostrando incluso células en apoptosis. Estos datos mostraron que las células MDCK eran permisivas a la infección por PVC.

CURVA DE REPLICACIÓN VIRAL

Para la cuantificación por q-PCR primero se construyó una curva patrón usando el fragmento purificado de la proteína NS1 de PVC. Esto nos permitió cuantificar el número de copias genómicas de PVC en cada uno de los ensayos de infección. Se realizaron 4 ensayos de infección en células MDCK con PVC y se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 1. Se calculó un promedio del número de copias genómicas de NS1 obtenidos por qPCR de cada tiempo postinfección (Figura 31a). El análisis estadístico estableció que existen diferencias en el número de copias genómicas a lo largo del periodo de infección viral con una t-student ($p < 0.001$) se establecieron diferencias



entre los diferentes días de infección. Así se tuvo que el día 5 y 8 son diferentes estadísticamente al día 1 y también son diferentes entre sí; el número de copias genómicas es estadísticamente diferente en estos 3 días (Figura 1). Con estos resultados se decidió tomar como fase inicial (día 1), fase temprana (día 8) y fase tardía (día 11). En células tratadas con IFN al

cuantificar el número de copias genómicas de NS1 tuvieron una disminución estadísticamente significativa en los días 1, 3, 5 y 8 (figura 1). La cuantificación de copias genómicas con esta dosis de IFN mostró una disminución en la replicación viral de PVC, en los primeros días postinfección, debido a que se activa tempranamente la respuesta inmune del hospedero.

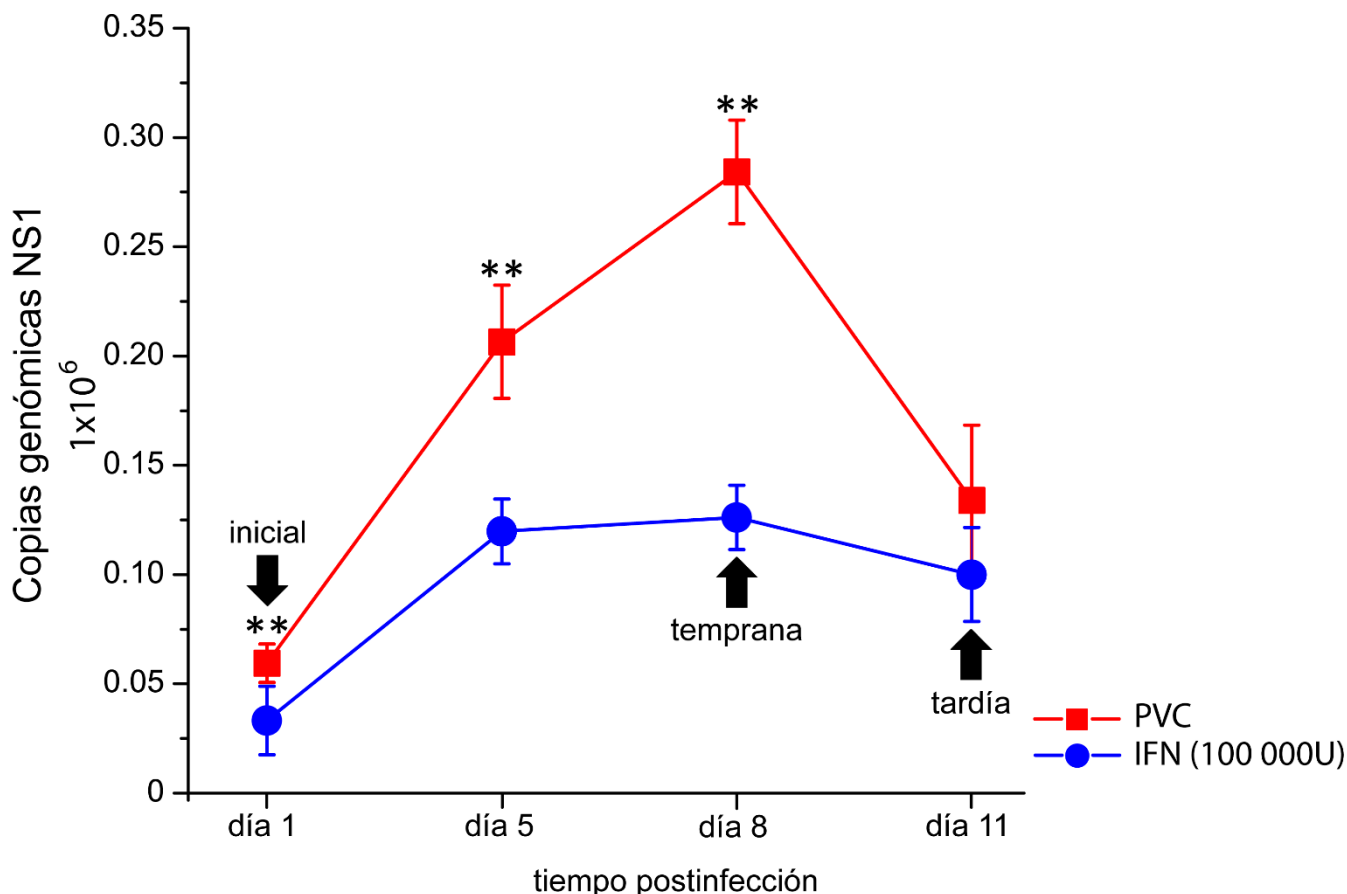


Figura 1. Curva Replicación viral de PVC. Se establecen 3 fases durante la infección por PVC; fase inicial (día 1), fase temprana (día 8) y fase tardía (día 11). El tratamiento con IFN (100 000U) disminuyó significativamente la replicación de PVC (puntos azules) con respecto a células solo infectadas con PVC (cuadros rojos) (** diferencias significativas $p < 0.001$)

FASE TEMPRANA Y FASE TARDÍA DE INFECCIÓN

En los siguientes ensayos solo se cuantificaron las proteínas de interés durante estas fases de infección viral y se utilizó la dosis de IFN de 100 000 U/ μ L por mostrar disminución en la replicación viral de PVC (figura 2, 3 Y 4).

TRANSCRITOS PROTEÍNAS VP2 Y NS1

Se cuantificaron los transcritos de las proteínas NS1 y VP2 de PVC y se establecieron dinámicas de

replicación viral. La primera proteína en expresarse es la NS1 (fase temprana) (figura 2a); seguida de una sobreexpresión de VP2 (fase tardía) (figura 2b). La primera está relacionada con una replicación activa de PVC y la segunda con la formación de viriones nuevos listos para salir del citoplasma celular (figura 2). Existe una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de VP2 en la fase temprana y tardía durante la infección activa por PVC; se observa la misma dinámica en la expresión de NS1. En células tratadas con IFN (100 000 U/ μ L) y además infectadas con



PVC, existe una diferencia significativa en el incremento en la expresión durante ambas fases de infección. Tanto la expresión de VP2 como la de NS1 se ve drásticamente disminuida en las células tratadas con IFN, lo que sugiere se activan tempranamente mecanismos antivirales que ayudan a disminuir la replicación de PVC.

TRANSCRITOS IFN β

En cuanto a la cuantificación del número de transcritos de RNAm de IFN β se encontró que existen niveles basales en las 3 fases de infección en células que no fueron infectadas ni tratadas con IFN exógeno (figura 3). Lo mismo se observó en células tratadas con IFN exógeno, lo que sugiere que se necesita además de la presencia de IFN, un estímulo extra como el reconocimiento de los viriones de PVC para desencadenar la producción y expresión de IFN β . En células tratadas con IFN exógeno (100 000 U/ μ L) e infectadas con PVC, la expresión de IFN β se inició en la fase temprana (14 incrementos) y se incrementó hasta >360 incrementos (figura 3) en la fase tardía. Ambos estímulos el IFN exógeno y el virión de PVC son probablemente los que desencadenan la expresión de IFN β , para activar con esto mecanismos antivirales de control viral. El mismo comportamiento de expresión se observa en células infectadas con PVC, solo que los niveles de expresión fueron más marcados, ya que van desde 106 incrementos en la fase temprana, hasta >700 incrementos durante la fase tardía. Esto sugirió una activación temprana de la respuesta inmune innata más eficiente que las células tratadas con IFN exógeno (figura 3).

TRANSCRITOS IFIT1 E IFIT3

En células tratadas con IFN exógeno (100 000 U/ μ L) se cuantificaron niveles basales de IFIT1 e IFIT3 en las dos fases de infección (figura 4a y 4b). En células tratadas con IFN exógeno (100 000 U/ μ L) e infectadas con PVC la proteína IFIT1 se expresó tempranamente (15 incrementos) y alcanzó niveles de expresión (20 incrementos) en la fase tardía (figura 4a). Por otro lado, la proteína IFIT 3 en el mismo grupo de células mostraron incrementos mayores, en la fase temprana (26, incrementos) y en la fase tardía (56 incrementos) (figura 4b). esto sugiere que la proteína IFIT1 se expresa en menor cantidad que la IFIT3, lo cual puede ser debido a los mecanismos y rutas de señalización activadas en las células. En células infectadas con PVC la expresión de IFIT1 e IFIT3 tuvo el mismo comportamiento que las células anteriormente descritas, sin embargo, los incrementos $2^{-\Delta\Delta CT}$ fueron mayores. Así la proteína IFIT1 tuvo en la fase temprana 10 y en la fase tardía, 23 (figura 4a). Mientras que la proteína IFIT3, en la fase temprana tuvo 175 y la fase tardía 660 (figura 4b). Aun cuando los incrementos de $2^{-\Delta\Delta CT}$ en estas células son mayores, esto no fue suficiente para controlar la infección por PVC, como lo muestra el número de copias genómicas.

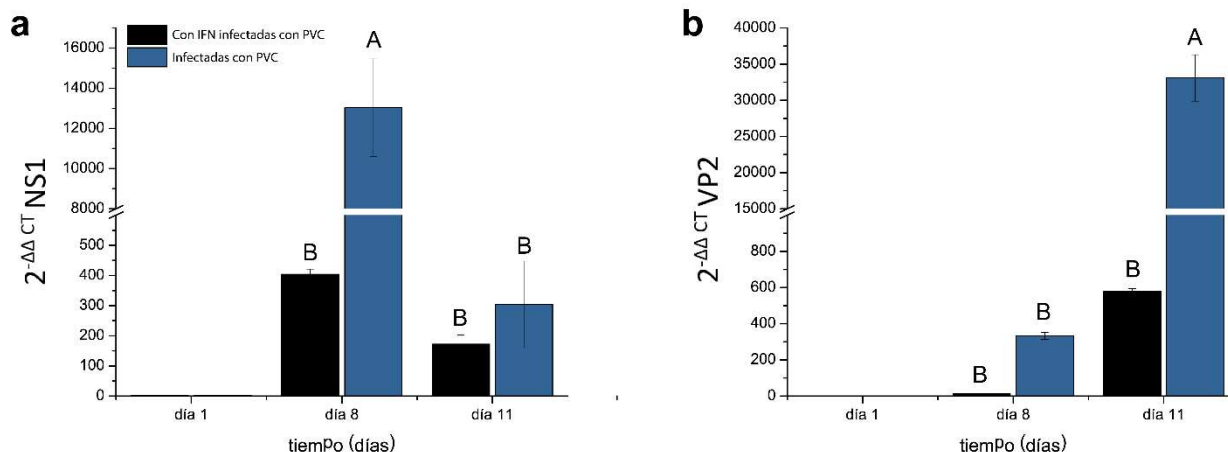


Figura 2. Cuantificación por q-PCR de la expresión de NS1 y VP2. **a)** Incremento en la expresión de la proteína NS1, durante la fase temprana y tardía de infección por PVC, siendo el día 8 el pico de mayor expresión de la proteína. **b)** Incremento en la expresión de la proteína VP2 en ambas fases de infección; el pico de expresión se da en el día 11. Se muestra en las barras azules las células infectadas con PVC y en barras negras las células tratadas con IFN (100 000U) e infectadas con PVC. (Letras iguales no existe diferencia estadísticamente significativa; letras diferentes tienen diferencia estadística significativa).



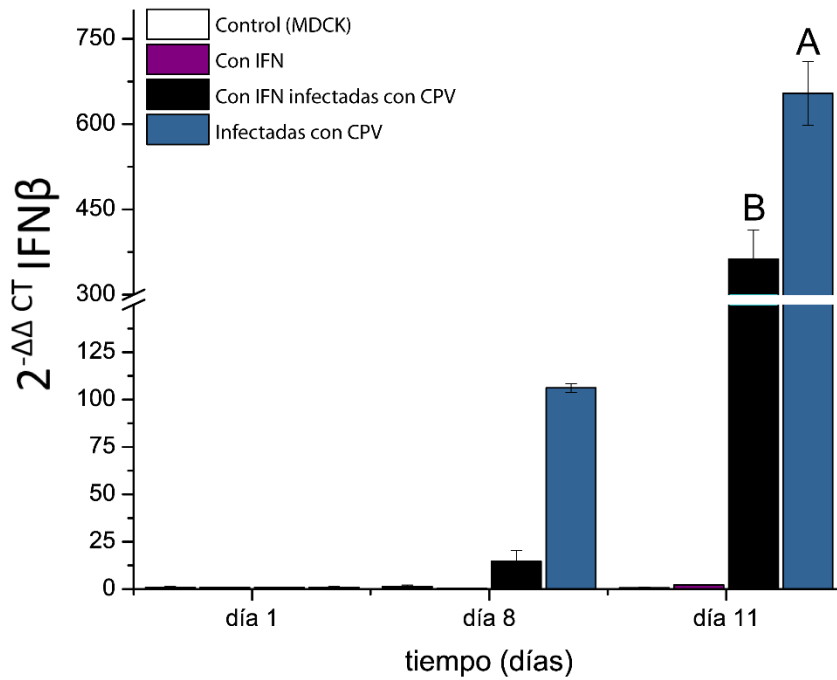


Figura 3. Cuantificación por q-PCR de la expresión de IFN β . Se inicia la expresión de IFN β en la fase temprana (día 8) y aumenta en la fase tardía (día 11) se observa misma tendencia en células infectadas con PVC y células tratadas con IFN e infectadas con PVC, lo que parece activar tempranamente la respuesta inmune innata y con esto existe una disminución de PVC en estas células. (Letras iguales no existe diferencia estadísticamente significativa; letras diferentes tienen diferencia estadística significativa).

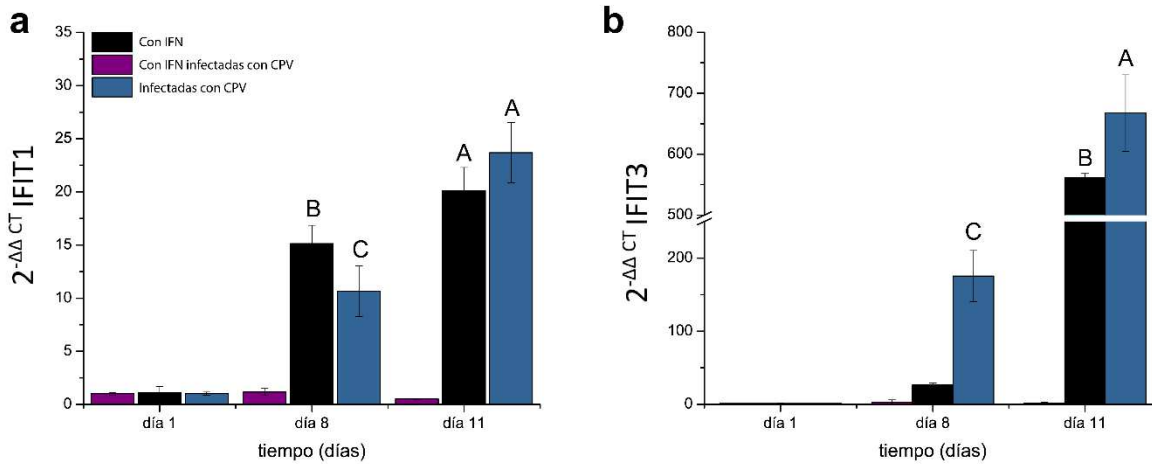


Figura 4. Cuantificación por q-PCR de la expresión de IFIT 1 e IFIT3. Se registran los niveles basales de ambas proteínas en las células sin infectar (fase inicial). **a)** En la fase temprana (día 8) en ambos tratamientos la expresión de IFIT1 es estadísticamente diferente; mientras que en la fase tardía (día 11) la expresión de IFIT1 es igual estadísticamente. **b)** Se registran los niveles basales de IFIT3 en la fase inicial. En la fase temprana la expresión de IFIT3 es estadísticamente menor en las células tratadas con IFN exógeno, con respecto a las células infectadas con PVC; en la fase tardía los incrementos de la expresión de la proteína IFIT3 son estadísticamente diferentes, siendo mayor en las células infectadas con PVC. (Letras iguales no existe diferencia estadísticamente significativa; letras diferentes tienen diferencia estadística significativa).



DISCUSIÓN

Los virus han montado mecanismos moleculares que les permiten lograr una infección exitosa en una célula hospedera. Por otro lado, el sistema inmunitario del hospedero ha montado mecanismos de control viral lo que le permite sobrevivir y erradicar infecciones virales casi por completo (Pilchmair *et al.*, 2011, 2014). Existe una modulación de ambas respuestas lo que ha permitido por un lado a los virus infectar exitosamente a una célula, pero por otro al hospedero le ha permitido poder sobrevivir controlando la replicación viral. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran y dejan a la luz algunos mecanismos moduladores de la respuesta inmune ante una infección viral, usando como modelo PVC.

En el presente trabajo se cuantificaron el número de copias genómicas virales de PVC (VP2 y NS1) y se establecieron claramente tres momentos en el ciclo viral, una fase inicial (condiciones iniciales), una fase temprana (día 8) donde el número de copias genómicas se mantiene bajo y da pie a la fase tardía (día 11) donde la replicación viral de PVC crece exponencialmente. El establecimiento de estas fases de infección nos permitió cuantificar las citocinas proinflamatorias durante una infección viral como lo es el IFN β , responsable del inicio de la transcripción de proteínas antivirales como las IFIT (Fensterl *et al.*, 2011). La proteína NS1 se sobreexpresó durante la fase temprana (día 8) lo que sugiere es la primer proteína que se transcribe durante el inicio de la replicación de PVC, seguida de una sobreexpresión de VP2 durante la fase tardía (día 11) responsable del ensamblado de viriones de PVC. Esta dinámica de replicación viral no había sido reportada completa con anterioridad, en este trabajo se categoriza a NS1 como responsable del inicio de la replicación y a VP2 responsable de la formación de viriones nuevos listos para salir del citoplasma celular.

La respuesta inmune innata mediada por el interferón (IFN β), ante infecciones virales proporciona una robusta primer línea de defensa contra patógenos virales invasores (vía MAVS). Tras la detección de virus y posterior producción de IFN β . Se empiezan a expresar genes regulados por IFN (ISGs), como las proteínas antivirales IFIT lo que conduce a un probable control de la infección viral. Por otro lado, las moléculas de IFN se pueden unir a células con receptores en su superficie celular para IFN e iniciar una cascada de señalización a través del transductor de señal de Janus quinasa y el activador de la transcripción (JAK-STAT). Los IFNs poseen la habilidad de proteger las células de las infecciones virales. La actividad del tipo I (α y β) y del tipo II (γ) es ser parte de los mecanismos de defensa antiviral. Algunos virus bloquean la inducción de IFN responsable de la activación de la señalización

por la vía JAK (Janus Kinase) (Transductores y activadores de la transcripción) e inhiben la activación de vías efectoras de IFN induciendo un estado antiviral en la célula al limitar la replicación viral (Alcami y Ulrich, 2000). Esto culmina con la inhibición de la formación de la doble cadena de RNA dependiente de la activación de la proteína quinasa (PKR), fosforilación del factor 2 α de inicio de la traducción (Eif-2) y el sistema RNasa L, el cual degrada el RNA viral y arresta o interrumpe la traducción en las células hospederas.

Así lo demuestran el número de transcritos de RNAm de IFN β , en células infectadas con PVC y en células tratadas con IFN exógeno e infectadas con PVC. Las células tratadas con IFN exógeno activan tempranamente la expresión de IFN β lo que permite disminuir el número de copias genómicas de PVC desde la fase temprana. Estos niveles de expresión de IFN β aumentan en la fase tardía logrando disminuir la replicación de PVC. En células infectadas con PVC se observaron niveles de expresión mayores pero el número de copias genómicas de PVC no disminuyeron; por el contrario, tuvieron incrementos mayores. Se obtuvieron resultados similares que en infecciones reportadas de los virus: Herpes simple virus, Adenovirus, Cytomegalovirus (Schneider *et al.*, 2014). Mattei y colaboradores en el 2013 examinaron la respuesta inmune innata a MVMp (minute virus del ratón), infectando MEFs (fibroblastos de embriones de ratón) con MVMp, realizaron un experimento y midieron expresión de IFN I por RT-qPCR durante las primeras 72 horas postinfección. Encontraron una pequeña, pero estadísticamente significativa subregulación de IFN- α e IFN- β , especialmente a 48 horas postinfección. Reportaron también que existe una activación de STAT1. La respuesta de IFN inducida por la infección por MVMp fue similar a la observada con el Virus de la estomatitis vesicular (VSV). Estos resultados demostraron que la infección por MVMp, activa una respuesta de IFN.

Analizaron también si la replicación viral se ve afectada por la señalización a través del IFN- $\alpha\beta$. Y encontraron que el IFN- $\alpha\beta$ conduce a la expresión de varios genes estimulados por interferón (ISGs), induciendo un estado antiviral en células vecinas (Sen, 2007). El VSV, un virus que es sensible a los IFN de tipo I (Ito y Montagnier, 1977), disminuyó su replicación viral. Por el contrario, MVMp se sigue replicando igual en los MEFs deficientes de IFN- $\alpha\beta$ R; Estos resultados sugieren que los bajos niveles de IFN tipo I producidos durante la infección por MVMp en MEFs no son suficientes para inducir un estado antiviral en el cultivo celular. Caso contrario de VSV donde los niveles bajos de IFN si logran disminuir la replicación viral. Lo que sugiere que estos dos tipos de virus desencadenan vías diferentes de control antiviral, uno parece estar mediado por RIG- I y MAVS (VSV).



El control de la replicación y patogénesis del virus depende de la rápida detección de las partículas virales por la célula y su capacidad para montar una respuesta antiviral inmediata para limitar la propagación del virus a las células vecinas. La respuesta antiviral en la infección por PVC se activa por vías de señalización que involucran RIGI-MAVS que conduce a la inducción transcripcional de genes antivirales como las proteínas IFIT vía IFN β .

Los genes IFIT son rápidamente inducidos por infección de varios virus, puede ser a través de vías IFN-dependientes e independientes. En la última década, se ha relacionado a estas proteínas con la inhibición de las infecciones virales, mediante múltiples mecanismos, por ejemplo, suprimiendo el inicio de la traducción, por la unión a RNA-cap y por secuestro de proteínas o ARN en el citoplasma (Diamon y Farza, 2012).

Además de ser descritas como proteínas antivirales, las IFIT originalmente se describieron por su unión a PPP-ARN, sin disminuir el IFN I en fibroblastos de ratón, macrófagos o células dendríticas que carecen de IFIT1. Posteriormente, se propuso que la disminución de IFIT1 daba como resultado un decremento de la respuesta pro-inflamatoria después del tratamiento con LPS en células (Vladimer *et al.*, 2014).

Las proteínas IFIT median la respuesta inmune innata al interactuar por ejemplo IFIT3 con TBK1, una cinasa importante en la modulación de la respuesta inmune innata. Esta interacción IFIT3-TBK1 permite su unión con MAVS en la mitocondria. Una sobreexpresión de IFIT3 incrementa la expresión de genes antivirales. (Berchtold y colaboradores, reportaron en 2008 que la sobreexpresión de IFIT2 en macrófagos de ratón reduce múltiples citocinas proinflamatorias aun siendo inoculados con LPS. Esta respuesta puede ser debida a las funciones naturales de las IFIT al unirse directamente con RNA y sobreexpresarse ocasionando daño intrínseco en los tejidos celulares (Stawowczyk *et al.*, 2011).

IFIT 1 e IFIT2 se ha propuesto interactúan directamente con STING (ISG) (Li *et al.*, 2009). El cual recluta TBK1 (vía alterna además de la de IFIT3) y propaga la fosforilación para finalmente activar IRF3, NF- κ B y la producción de IFN junto con MAVS (Ishikawa y Barber, 2008; Paludan y Bowie, 2013), en este caso la sobreexpresión de IFIT1 en células HEK resulta en decremento de activación de IRF3 e IFN β . Aquí IFIT1 se describe como disruptor de la interacción de STING con MAVS o TBK1 (Li *et al.*, 2009).

Con el tratamiento exógeno de IFN en células MDCK que no son infectadas con PVC, se obtuvieron niveles basales IFIT1 e IFIT3 que puede ser debido a que estas proteínas antivirales inician su expresión solo ante el estímulo viral y no solo están relacionadas con la secreción de IFN, es decir se necesita de ambos

estímulos: la secreción de IFN β y la entrada de PVC para desencadenar la expresión de proteínas antivirales IFIT1 e IFIT3.

Nuestros resultados muestran que la secreción temprana y mantenida de IFN β permite la expresión prematura de proteínas antivirales IFIT1 e IFIT3; logrando que los niveles de RNAm de estas proteínas se eleven desde la fase temprana e incrementen en la fase tardía de infección, lo que refleja en células tratadas con IFN exógeno la disminución en el número de copias genómicas de VP2 y NS1 en ambas fases de infección. Es decir, se disminuye la replicación de PVC al activar tempranamente tanto la secreción de IFN β , como de IFIT1 e IFIT3. Esto nos demuestra que una activación temprana del sistema inmune innato desencadena una secreción de proteínas antivirales que ayudan a la célula hospedera a hacer frente a la infección viral por PVC.

Con todos estos resultados se demuestra que existe una modulación molecular de la respuesta inmune ante una infección viral. El control es direccionado por el IFN β que es el encargado de iniciar la expresión de proteínas antivirales que son las encargadas de disminuir la replicación viral y eliminar las partículas virales, permitiendo que las células hospederas logren sobrevivir.

El virus por otro lado parece logra momentáneamente mantener inactiva la respuesta antiviral al acoplarse tempranamente con la membrana mitocondrial, estableciendo una despolarización membranar lo que desacopla proteínas asociadas a la mitocondria que son reguladoras de la señalización de secreción de IFN β . Existe una correlación entre el número de partículas virales de PVC, y el número de transcritos de RNAm de IFN β , en una fase temprana; existe además una asociación directa del PVC con la mitocondria y esta incrementa en la fase tardía donde activan probablemente mecanismos apoptóticos donde la célula ya es incapaz de hacer frente a la infección viral (Zhou *et al.*, 2011).

REFERENCIAS

1. **Aimee, E. y Craig, T.** (2004). Death by desing: apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology*. 16:663-669.
2. **Akira, S. y Takeda, K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 4:499-511.
3. Alcami, A. y Ulrich, K. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol today*. 21(9):447-455.
4. **Allison, A., Kohler, D., Ortega, A., Hoover, E. y Grove, D.** (2014). Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation ti different carnivore species. *Plos Pathog*. 10(11) e1004475. doi:10.1371/journal.ppat.1004475.
5. **Andrejeva, J., Childs, K., Young, D., Carlos, T., Stock, N., Goodbourn, S. y Randall, R.** (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFNbeta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*101:17264-17269.



6. **Arnoult, D., Soares, F., Tattoli, I. y Girardin, E.** (2011). Mitochondria in innate immunity. *EMBO reports*. 12(9):901-911.
7. **Appel, J., Scott, F. y Carmichael, L.** (1979) Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec*. 105:156–159.
8. **Attardi, G. y Schatz, G.** (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:289–333.
9. **Dixit, E., Boulant, S., Zhanh, Y., Lee, A., Odendall, C., Shum, B., Hacohen, N., Chen, Z., Whelan, S., Fransen, M., Nibert, M., Superti-Furga, G. y Kagan, J.** (2010). Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*. 141:668–681.
10. **Dostert, C.** (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 320:674–677.
11. **Ekert, P. y Vaux, D.** (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol*. 17:626–630.
12. **Everett, H. y McFadden, G.** (1999). Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 7: 160–165.
13. **Fensterl, V. y Sen, G.** (2011). The ISG56/IFIT1 Gene Family. *J Interferon Cytokine Res.*; 31:71–78.
14. **Fritz, H., Ferrero, R., Philpott, D. y Girardin, S.** (2006) nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*7:1250–1257.
15. **Galluzzi, L., Kepp, O. y Kroemer, G.** (2012). Mitochondria: master regulators of danger signaling. *Nature Rev.* 13:780-788.
16. **Garedeu, A., Henderson, S. y Moncada, S.** (2010) activated macrophages utilize glycolytic atpto maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 17:1540–1550.
17. **Green, D., Galluzzi, L. y Kroemer, G.** (2011). Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science* 333:1109–1112.
18. **Kagan, J., Giri, V. y Wu, H.** (2014). SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat Rev Immunology*. 14:821-826.
19. **Kalvakolanu, D.V.** (1999). Virus interception of cytokine-regulated pathways. *Trends Microbiol.* 7: 166-171.
20. **Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O. y Akira, S.** (2005) Cell type-specific involvement of RIG-in antiviral response. *Immunity*. 23:19–28.
21. **Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K., Takeuchi, D. y Akira, S.** (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6:981-988.
22. **Kerr, J., Wyllie, A. y Currie, A.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26(4):239–257.
23. **Koshiba, T., Yasukawa, K., Yanagi, Y. y Kawabata, S.** (2011) mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci Signal* 4:ra7
24. **Koshida, T.** (2013). Mitochondrial-mediated antiviral immunity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833:225-232.
25. **Moore, C. y Ting, J.** (2008). Regulation of mitochondrial antiviral signaling pathways. *Immunity*28:735-739.
26. **Morita, S., Shimanouchi, T., Sasaki, M., Umakoshi, H. y Kuboi, R.** (2003). Detection of a heat stress-mediated interaction between protein and phospholipid membrane using dielectric measurement. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95(3):252–256.
27. **Motshwene, P., Moncrieffe, M., Grossmann, J., Kao, C., Ayalur, M., Sandercock, A., Robinson, C., Latz, E. y Gay, N.** (2009). an oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J. Biol. Chem.* 284:25404–25411.
28. **Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R.** (2009) Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *J Mol Cell Cardiol.* 46: 781–788.
29. **Muzyczka, N. y Berns, K.** (2001) Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M, Howley, P.M (Eds.), *Fields Virology 4th ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 2327–2359.
30. **Nykky, J., Tuusa, J., Kirjavainen, S., Vuento, M. y Gilbert, L.** (2010) Mechanisms of cell death in canine parvovirus-infected cells provide intuitive insights to developing nanotools for medicine. *Int J Nanomedicine*. 5: 417–428.
31. **Nykky, J., Vuento, M., Gilbert, L.** (2014). Role of Mitochondria in Parvovirus Pathology. *PLOS ONE*. 9(1):1-10.
32. **Onoguchi, K., Onomoto, K., Takamatsu, S., Jogi, M., Takemura, A., Morimoto, S., Julkunen, I., Namiki, H., Yoneyama, M. y Fujita, T.** (2010) Virus-infection or 5'pppnaactivates antiviral signal through redistribution of ipS-1 mediated by MFn1. *PLoS Pathog* 6:e1001012.
33. **Op De Beeck, A., Sobczak-Thepot, J., Sirma, H., Bourgain, F., Brechot, C. y CailletFauquet, P.** (2001). NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). *Journal of Virology*. 75(22):11071–11078.
34. **Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P.** (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:552–565.
35. **Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. y Seya, T.** (2003a). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- β . *J. Biol. Chem.* 278:49751–49762.
36. **Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. y Seya, T.** (2003b). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nature Immunol.* 4:161–167.
37. **Parker, J. y Parrish, C.** (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *Journal of Virol.* 74(4):1919-1930.
38. **Sarkar, S. y Sen, G.** (2004). Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol Ther.*; 103:245–259.
39. **Scott, I. y Norris, K.** (2008). The mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS, is cleaved during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375:101-106.
40. **Sen, G. y Sarkar, S.** (2007). The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.*; 316:233–250.
41. **Seth, R., Sun, L., Ea, C. y Chen, Z.** (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 122:669-682.
42. **Soucy-Faulkner, A., Mukawera, E., Fink, K., Martel, A., Jouan, I., Nzengue, Y., Lamarre, D., Vande Velde, C. y Grandvaux, N.** (2010) requirement of noX2 and reactive oxygen species for efficient RIG I-mediated antiviral response through regulation of MaVS expression. *PLoS Pathog* 6:e1000930.
43. **Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M., Wang, Z. y Germain, R.** (2013). The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153:348–361.
44. **Takeuchi, O. y Akira, S.** (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* 220:214-224.
45. **Takeuchi, O. y Akira, S.** (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 227:75–86.
46. **Takeuchi, O. y Akira, S.** (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140:805–820.
47. **Wang, D., Yuan, W., Davis, I. y Parrish, C.** (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology*. 240:273–281.
48. **Wang, X.** (2001).The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15:2922–2933.



49. **Wasilenko, S., Stewart, T., Meyers, A. y Barry, M.** (2003) Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:14345–14350.
50. **Werd, N., Samarajiwa, S. y Hertzog, P.** (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem*. 282:20053-20057.
51. **West, A., Shadel, G. y Ghosh, S.** (2011). Mitochondria in innate immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* 11:389–402.
52. **Wu, B., Peisley, A., Tetrault, D., Li, Z., Egelman, E., Magor, K., Walz, T., Penczek, P. y Hur, S.** (2014). Molecular imprinting as a signal activation mechanism of the viral RNA sensor RIG-I. *Mol. Cell*. 55:511–523.
53. **Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P. y Shu, H.** (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29:538-550.
54. **Zhou, R., Yazdi, A., Menu, P. y Tschopp, J.** (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 469:221-225.





La Asociación Mexicana de Microbiología, A.C.
(Fundada en 1949)

Otorga la presente

constancia a:

Tania Reyes Cruz

Por su asistencia y la presentación del Cartel

*Subexpression of FFB, FFI1 and FFI3 proteins
in MDCK cells infected with Canine Parvovirus*

Durante el "XL Congreso Nacional de Microbiología",
celebrado del 02 al 05 de abril de 2017, en Guadalajara, Jal.


Dr. Alfredo Herrera Estrella
Presidente