



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**INHIBICIÓN DE UNA INFECCIÓN VIRAL DE  
BACULOVIRUS CON RNA DE  
INTERFERENCIA.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A:  
VÍCTOR JULIÁN VALDÉS RODRÍGUEZ



BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F.

2004.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO

## LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

**Dr. José Narro Robles**  
**Director de la Facultad de Medicina**  
**UNAM**  
**Presente**

Por este conducto le informamos que la tesis "Inhibición de una infección viral de Baculovirus con RNA de Interferencia", que presenta el alumno: **Victor Julián Valdés Rodríguez**, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto los suscritos miembros del Jurado otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Atentamente.

Dr. Félix Recillas Targa

Dr. Luis Vaca Dominguez

Dr. Luis Padilla Noriega

Dr. Jesús Chimal Monroy

Dr. Ángel Zarain Herzberg

Este trabajo se realizó  
bajo la dirección y asesoramiento  
del Dr. Luis Vaca Domínguez  
en el departamento de Biología Celular  
del Instituto de Fisiología Celular  
de la Universidad Nacional Autónoma De México.



## Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México | por todo y más.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas | por ser la sede fundadora de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica.

A la L.I.B.B y a todos mis profesores | por su excelencia y brindarme el ambiente académico propicio para llevar a cabo mi proyecto de vida.

Al Laboratorio del Dr. Enrique Ortega | En especial a Claudia Garay, por aceptarme en su laboratorio el primer año de la licenciatura y por sentar las bases del rigor académico.

Al Laboratorio del Dr. Roberto Cória. En especial a Alma Saviñón y Alejandro Lloret | Por enseñarme ha hacer bien las cosas, por la confianza y amistad.

Al Laboratorio del Dr. Wilhelm Hansberg. En especial a Adelaida Díaz y Leonardo Peraza | Por enseñarme el verdadero significado del rigor científico.

Al Laboratorio del Dr. Luis Vaca. | Por permitirme ser parte de su equipo de investigación.

A la Unidad De Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular | Por su excelente servicio y ayuda profesional.

A la Unidad De Computo del Instituto de Fisiología Celular | Por excelente ayuda técnica.

Al Dr. Mark West | Por su ayuda técnica pero sobre todo por su personalidad y amistad.

A la coordinación de Enseñanza del IIBm, en especial a Azucena y a Ada | Muchas gracias.

A PROBETEL por el apoyo económico recibido durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio 126 Norte | Por su incesante discusión y crítica, gracias por crear un ambiente académicos riguroso y propicio para la discusión y generación de ideas científicas.

Al Instituto Escuela del Sur, el IE | Por sentar las bases de lo que soy hoy y haber sido un pilar en mi formación.

A mi Padre,

## **Agradecimientos Personales**

A mi Papá y a mi Mamá. Soy lo que soy, y seré lo que seré gracias a ustedes, su cariño, su guía, y su ejemplo a seguir.

A mi hermano Emilio, por enseñarme tantas cosas, te quiero mucho.

A mi mejor amigo Rodrigo. Por demostrarme lo que es un verdadero Amigo a lo largo de tantos y tantos años.

A Viviana, por hacerme vivir algunos de los mejores momentos de mi vida, te quiero mucho.

A mi buen amigo Bernardo y Familia, gracias por su amistad única y sincera.

A Ariana, gracias por ser como eres, porque siendo como eres, tu sólo presencia ha sido un apoyo y guía, neto gracias.

A mis compañeros del IE, en especial a Olivia y a Sebastián, por que tu sabes lo importantes que fueron para mi y porque recordar es volver a vivir.

A Con, porque siempre estas cuando te necesito, gracias por tu cariño y compañía.

A Bertita, porque me has enseñado tantas cosas, porque me has enseñado lo que es la bondad, el cariño, el amor al prójimo y tantas cosas que sólo tu con tu sabiduría me han hecho ver. Hoy no sería la persona que soy sin ti abuelita.

A mi abuelito Luis cuya memoria, rectitud, honradez y honestidad marcan mi camino.

A mi tío Luis. Porque sin darte cuenta me has enseñado y has sido una guía.

A Poncho, por de-verdad ser un amigo, por de-verdad ser una persona.

A Adelaida, una de mis mejores amigas, gracias por poder confiar en ti.

A Andrea, por la fortuna de que nuestros caminos se hallan cruzado.

A Rosa y Ernesto por su ayuda y consejo.

Al Dr. Luis Vaca, un ejemplo a seguir.

Dedico este trabajo a mis Abuelos  
Luis Rodríguez y Bertha Breillard.

# ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	
Capitulo I: Baculovirus	3
▪ Biología de Baculovirus	3
▪ Ciclo de Infección de AcMNPV	4
▪ Baculovirus Recombinantes	7
Capitulo II: RNA de interferencia	8
• El Fenómeno de RNA de interferencia	8
• El mecanismo del RNAi	9
• El Papel fisiológico del RNAi	10
➢ Sistema de defensa contra Virus	10
➢ Regulación Epigenética	10
➢ Micro RNAs	12
• Tecnología con Base en RNAi; aplicaciones y terapéutica	14
• El Papel fisiológico del RNAi	10
• El Papel fisiológico del RNAi	10
• El Papel fisiológico del RNAi	10
Objetivo   Justificación	17
Hipótesis	18
Metodología	
▪ Cultivo celular de Células Sf21	19
▪ Producción del Baculovirus Recombinante AcMNPV-GFP	19
▪ Síntesis de dsRNA	19
▪ Purificación de dsRNA con Fenol:Cloroformo	20
▪ Transfección del dsRNA	20
▪ Producción de siRNAs	20
▪ Microscopía Confocal	21
▪ Ensayos de b-galactosidasa	21
▪ Ensayos de Placa y determinación del título viral	21
▪ RT-PCR semicuantitativo	22

▪ Microscopia Electrónica	23
▪ Infección de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	23
Resultados	
▪ Las células Sf21 infectadas con AcMNPV-GFP expresan la proteína fluorescente verde	24
▪ La transfección de las células de insecto con dsRNA homólogo a gp64 o gfp inhibe la producción de GP64 y GFP de células infectadas a baja MOI (0.05)	25
▪ El dsRNA se localiza en el interior del citoplasma celular	28
▪ El efecto observado es debido al dsRNA y no al ssRNA	29
▪ El dsRNA-gfp tiene un efecto prolongado para inhibir la traducción del mensajero de GFP	29
▪ La transfección de células de insecto con dsRNA homólogo al gen viral ie1 inhibe el progreso de la infección viral	30
▪ Los siRNAs tienen el mismo efecto para inhibir genes virales que el dsRNA	35
▪ El dsRNA es capaz de inhibir la infección viral de Baculovirus in vivo	39
Conclusiones	43
Discusión	
El RNAi como una Alternativa a la Genética Reversa en Baculovirus	45
El RNAi y la Validación de Blancos Terapéuticos	46
El RNAi Como Terapia Antiviral	47
Perspectivas	49
Referencias	50
Anexo I:	
<u>Valdes VJ</u> , Sampieri A, Sepulveda J, Vaca L. <i>Using double-stranded RNA to prevent in vitro and in vivo viral infections by recombinant baculovirus</i> . J Biol Chem. 2003 May 23;278(21):19317-24.	56
Anexo II:	
C. Fabian Flores-Jasso, <u>Victor Julian Valdes</u> , Alicia Sampieri, Viviana Valadez-Graham, Felix Recillas-Targa and Luis Vaca. <i>Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference</i> . Virus Res. 2004 Jun;102(1):75-84.	57



## RESUMEN

---

La introducción de RNA de doble hebra (dsRNA) a una célula o sistema desencadena un fenómeno de silenciamiento postranscripcional resultado de la degradación del RNA mensajero homólogo al dsRNA. A este tipo de silenciamiento se le conoce como RNA de interferencia o RNAi.

Actualmente el RNAi es una poderosa herramienta para silenciar de manera específica y potente la expresión de genes de manera postranscripcional. El RNAi ha sido observado en una gran cantidad de organismos eucariontes; desde levaduras y hongos, hasta plantas y mamíferos.

Los usos de una tecnología como ésta abren la posibilidad de determinar la función de destinos genes, representando una opción a la genética reversa clásica. Por otro lado se antoja pensar que la tecnología en base a RNAi pudiera ser utilizada para interferir con la expresión de genes causantes de patologías en distintas enfermedades.

Los Baculovirus son una extensa familia de virus extremadamente citotóxicos que infectan insectos en etapa larvaria. En el presente trabajo se utilizó al Baculovirus *Autographa californica* (AcMNPV) como modelo para demostrar que la interferencia de genes virales vía RNAi durante el proceso de infección es posible.

En células de insecto Sf21 la transfección de dsRNA homólogo al gen *gfp*, (previa infección) resulta en una inhibición de la fluorescencia en células infectadas con AcMNPV-GFP. La desaparición de la fluorescencia se debe a la ausencia del mensajero de GFP que resulta en la ausencia de la proteína como se demostró por RT-PCR, Western blot y microscopía confocal. Usando las mismas metodologías se demostró que la transfección de dsRNA homólogos a los genes virales *gp64*, o *ie1* resultan en una inhibición de la infección viral. La proteína codificada por *gp64* es la principal glicoproteína de la cápside de los Baculovirus y es esencial para la infección célula-célula. Por su parte *ie1* codifica para el factor temprano de transcripción del mismo nombre cuya función es esencial para iniciar la etapa tardía de infección de este virus.

Dada la eficiencia y especificidad para inhibir genes virales e inhibir el progreso de la infección de Baculovirus AcMNPV-GFP, nos dimos a la tarea de probar si la misma inhibición lograda *in vitro* sería posible en animales. Para esto inyectamos larvas del escarabajo *Tenebrio molitor* con dsRNA homólogo a *gfp* o a *ie1* 24 horas previas a la administración de una dosis letal del virus Baculovirus-AcMNPV-GFP. Los resultados obtenidos muestran que el dsRNA-*gfp* inhibe la expresión del gen reportero en las larvas infectadas pero no así el progreso de la infección viral y la muerte de los insectos. Por su parte dsRNA-*ie1* fue capaz de inhibir el progreso de la infección viral en las larvas de insecto, evidenciado por la ausencia del reportero GFP y la supervivencia de los insectos a la administración del virus.

En este trabajo demostramos que la inhibición de genes virales esenciales para la infección es posible utilizando RNA de interferencia y que esto podría ser una herramienta invaluable desde el punto de vista terapéutico y en la validación de blancos terapéuticos.

## ABSTRACT

---

Introduction of double-stranded RNA (dsRNA) into a wide variety of cells and organisms results in post-transcriptional depletion of the homologue endogenous mRNA. This well-preserved phenomenon known as RNA interference (RNAi) is present in evolutionarily diverse organisms such as plants, fungi, insects, metazoans, and mammals. Because the identification of the targeted mRNA by the RNAi machinery depends upon Watson-Crick base-pairing interactions, RNAi can be exquisitely specific. We took advantage of this powerful and flexible technique to demonstrate that selective silencing of genes essential for viral propagation prevents *in vitro* and *in vivo* viral infection. Using the baculovirus *Autographa californica*, a rapidly replicating and highly cytolytic double-stranded DNA virus that infects many different insect species, we show for the first time that introduction of dsRNA from gp64 and ie1, two genes essential for baculovirus propagation, results in prevention of viral infection *in vitro* and *in vivo*. This is the first report demonstrating the use of RNAi to inhibit a viral infection in animals. This inhibition was specific, because dsRNA from the polyhedrin promoter (used as control) or unrelated dsRNAs did not affect the time course of viral infection. The most relevant consequences from the present study are: 1) RNAi offers a rapid and efficient way to interfere with viral genes to assess the role of specific proteins in viral function and 2) using RNAi to interfere with viral genes essential for cell infection may provide a powerful therapeutic tool for the treatment of viral infections.



# INTRODUCCIÓN

## CAPITULO I: BACULOVIRUS

### BIOLOGÍA DE BACULOVIRUS

Los Baculovirus comprenden una numerosa familia de virus que infectan artrópodos. Las larvas de *Lepidópteros* y *Coleópteros* son especialmente sensibles a la infección por este tipo de virus<sup>2,3</sup>. Los primeros reportes de una infección causada por Baculovirus se remontan al siglo XVI, en que se describe detalladamente la enfermedad de “*wilting*” que causaba la muerte a gusanos de seda. Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX en que se correlacionó directamente al Baculovirus como el agente causal de la enfermedad. En aquel entonces se lograron aislar pequeñas estructuras cristalinas llamadas *polihédras* en los gusanos infectados. En el interior de éstas se encontraban las partículas virales ocluidas (Fig1).

Actualmente el Baculovirus mejor estudiado es el aislado del *gusano medidor* (*Autographa californica*) de la alfalfa. Este Baculovirus fue denominado “*múltiple nucleocápsid polyhedrosis virus*”, o AcMNPV. Este virus tiene un genoma circular de DNA de cadena doble de 134 kilobases, y un número aun mayor de marcos de lectura abiertos (ORF)<sup>5</sup>. A pesar de que la secuencia completa del genoma de AcMNPV esta disponible hoy en día, se desconoce la función para la mayoría de las proteínas que codifican los distintos ORF<sup>6</sup>. Aproximadamente el 4% del genoma de AcMNPV corresponde a las llamadas “regiones homólogas”<sup>7</sup> (*hrs*), que se sabe interactúan con proteínas virales (por ejemplo IE1) y del hospedero para iniciar la transcripción de genes virales. Estas secuencias *hrs* también sirven como orígenes de replicación del DNA viral.

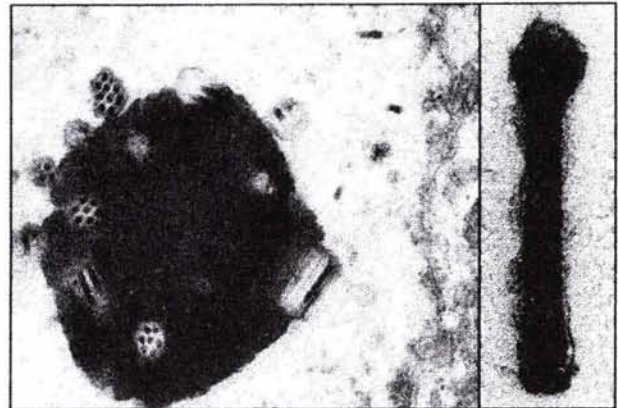


Figura 1.- Microscopía Electrónica de una partícula de Polihedrina (Izquierda) con viriones ocluidos (OV) en su interior. Derecha: acercamiento a un Virus Gemado (BV). El tamaño de la cápside viral es de 250 a 300 nm de largo por 30 a 60 nm de diámetro.

Las partículas virales de AcMNPV se presentan en dos formas diferentes<sup>8</sup>: los viriones ocluidos (OV) y los viriones gemados o libres (BV –*budded viruses*).

Los viriones ocluidos son los que están en los cuerpos cristalinos (polihedras) que se observan en los insectos infectados. Estos viriones están involucrados en la infección de un insecto a otro y por lo tanto en la infección primaria del hospedero.

Los virus gemados (BV) están compuestos de una nucleocápside y una membrana lipídica<sup>2</sup> que es adquirida en el momento en que los virus gemados salen – geman – a través de la membrana celular de la célula infectada<sup>9</sup>. Dentro de la nucleocápside se encuentra una sola copia del genoma circular de AcMNPV el cual se encuentra asociado a la proteína viral p6.9<sup>10</sup>. Esta es una proteína con carga positiva parecida a las protaminas que empaquetan el DNA en espermatozoides de mamíferos<sup>11</sup>.



## CICLO DE INFECCIÓN DE AcMNPV

El proceso de infección viral producida por muchos virus y en especial por Baculovirus-AcMNPV es un proceso altamente regulado y organizado desde el punto de vista molecular. En él intervienen una serie de proteínas que dan lugar a un proceso secuencial de infección<sup>12</sup>. En la figura 2 se ilustran los pasos que sigue la infección por Baculovirus, los cuales se describen a continuación.

El primer requisito para que se de cualquier infección viral es la entrada del virus al interior de la célula hospedero. En AcMNPV hay evidencia de que la glicoproteína GP64, el componente principal de la cápside de los virus gemados, está involucrada en la entrada del virus a la célula<sup>9,13</sup>. Esta entrada por GP64 parece ser una endocitosis mediada por receptores, promoviendo una fusión de membranas<sup>4</sup>, sin embargo, la identidad molecular del receptor para GP64 aún se desconoce. GP64 también ha sido asociada a la salida de la partícula viral del endosoma tardío al citoplasma celular. Una vez en el citoplasma, los viriones entran al núcleo celular a través de los poros nucleares, aparentemente mediado por polimerización de actina inducida por el mismo virus<sup>14,15</sup>. Una vez dentro, el DNA viral, aunque permanece asociado a la proteína p6.9, se desempaca y adopta una estructura nucleosomal menos compacta, iniciando la transcripción de los genes tempranos. Es interesante mencionar que el único requisito para llevar a cabo la infección de Baculovirus es la entrada del DNA viral al núcleo. De hecho, la transfección del genoma de Baculovirus en células de insecto es suficiente para que las células inicien la producción de viriones funcionales<sup>16</sup>.

Una vez que el DNA de Baculovirus llega al núcleo de la célula infectada, los factores de transcripción y la RNA Polimerasa II de la célula reconocen como propios algunos genes virales comenzando su transcripción<sup>17,18</sup>. La mayoría de los genes tempranos de Baculovirus tienen promotores con motivos consenso eucariontes, como por ejemplo cajas TATA<sup>19-21</sup>. A esta etapa de infección se le conoce como **etapa temprana**, y en ella se articula la maquinaria para llevar a cabo los procesos necesarios para el ensamblaje de nuevas partículas virales. Ejemplo de ello es la expresión de una DNA polimerasa viral<sup>22</sup>, (*dnapol-v*); encargada de duplicar el genoma viral, y una DNA hélicasa<sup>23</sup> (p143) esencial para empaquetar los genomas virales en las cápsides proteicas. Junto con estas proteínas se transcriben los factores tempranos de transcripción virales ie-0, ie-1 e ie-2<sup>24,25</sup>.

En esta etapa temprana los virus también inducen cambios y modificaciones en las células infectadas<sup>26</sup>. Por ejemplo, la reestructuración del citoesqueleto celular; las células se tornan redondas y el núcleo se hipertrofia y aumenta considerablemente su tamaño. La expresión de proteínas parecidas a toxinas, afecta la concentración intracelular de calcio y su distribución en el citoplasma<sup>27</sup>. Por otro lado factores antiapoptóticos (*iap*) muy poderosos, inhiben por completo el proceso de muerte celular programada al que entran todas las células infectadas<sup>28,29</sup>. Interesantemente, el factor antiapoptótico p35 de AcMNPV no sólo es capaz de inhibir la apoptosis en células de insecto sino que también ejerce su acción inhibitoria en neuronas de mamífero en cultivo<sup>30</sup>.

Los factores de transcripción generados en la etapa temprana, en especial IE1, son los encargados de llevar a la infección viral a una **segunda etapa**<sup>31,32</sup> (denominada la etapa tardía), donde ocurre la duplicación del DNA viral y la producción de viriones gemados (BV)<sup>33</sup>. Los factores de transcripción virales transcriben los genes que codifican proteínas



necesarias para ensamblar las primeras partículas virales, por ejemplo p6.9, una ubiquitinasa<sup>34</sup>, una superoxidodismutasa<sup>35</sup>, GP64<sup>36</sup> y p74<sup>37</sup>, estas dos últimas proteínas forman parte de la cápside viral<sup>38</sup>.

Una importante característica de la etapa tardía de infección es que ahora se comienzan a transcribir genes con promotores virales específicos. De hecho se sabe que en esta fase, es una RNA polimerasa viral resistente a *alfa-amanitina* la responsable de transcribir estos genes<sup>39</sup>.

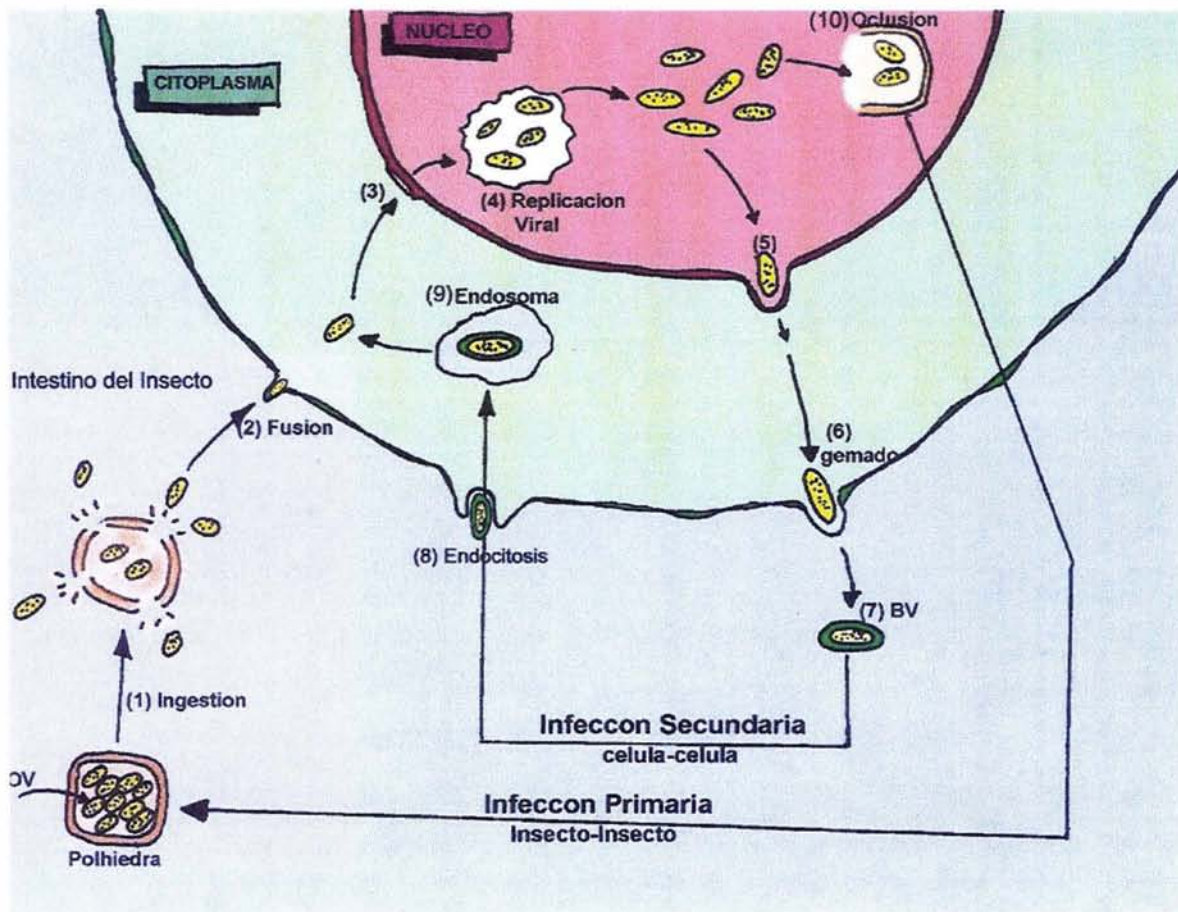
En esta etapa la amplificación de la maquinaria viral provoca que prácticamente la totalidad de la maquinaria celular del hospedero esté comprometida con la producción de virus. Se ha reportado una marcada disminución en los RNA mensajeros del hospedero y una disminución global de la síntesis de proteínas endógenas durante esta etapa de la infección viral<sup>40</sup>. La etapa de infección tardía comienza aproximadamente entre las 10 y las 12 horas de infección.

Alrededor de las 24 horas post-infección comienza lo que se conoce como la etapa **muy tardía** de infección de AcMNPV<sup>41</sup>. En esta última etapa se continúan produciendo una enorme cantidad de partículas virales, pero además comienza la transcripción de genes virales muy tardíos. Un ejemplo de estos es el gen *p10*, que codifica una proteína que ha sido relacionada con ensamblaje de microtúbulos que conlleva a la lisis de la célula infectada<sup>42,43</sup>. Otro gen tardío es *polh* que codifica para la proteína Polihedrina, que es el componente principal de la polihedra<sup>44</sup>. La producción de esta proteína es dependiente de la RNA polimerasa resistente a *alfa amanitina* de AcMNPV que reconoce un fuerte promotor viral dando como resultado una enorme cantidad de proteína. La Polihedrina forma agregados multiprotéicos en el interior del núcleo celular dentro de los cuales se empaquetan una gran cantidad de virus. A estos virus se les denominan virus ocluidos (OV)<sup>8</sup>. Los viriones ocluidos en estas estructuras protéicas permanecen así después de que la célula o el mismo insecto ha muerto y son muy resistentes al medio ambiente, en donde pueden permanecer por años sin perder su capacidad infectiva<sup>33</sup>. Estos viriones encapsulados en Polihedrina son los responsables de transmitir la infección a otro insecto<sup>45</sup>.

De esta manera, la infección de una célula por AcMNPV produce dos tipos de virus, los que están encapsulados en partículas de Polihedrina – producidos en la etapa muy tardía de infección - responsables de la infección insecto-insecto y partículas virales libres (BV), - producidos en la etapa tardía -que geman de la célula infectada y son los responsables de la infección célula-célula. Existe poco trabajo que hable respecto a las vías que determinan que viriones son encapsulados en Polihedrina y cuales no.

La infección primaria de Baculovirus ocurre de manera silvestre cuando las larvas de insectos ingieren accidentalmente partículas de Polihedrina y por consiguiente virus ocluidos<sup>33</sup>. Estos cuerpos cristalinos son excepcionalmente resistentes a la luz UV, desecación y en general a las condiciones medioambientales, protegiendo a los virus en el periodo intermedio de una infección a otra. Las partículas de Polihedrina están diseñadas para liberar la carga viral exactamente a la mitad del intestino del insecto, donde se absorbe la mayor cantidad de alimento y donde el pH es más alcalino, lo que desensambla la Polihedrina<sup>46</sup>. Los viriones liberados entran inicialmente a las células columnares epiteliales de la pared del intestino del insecto<sup>33</sup>. Esta entrada se da mediante una fusión de membranas promovida por p74, proteína de la cápside viral de los viriones ocluidos<sup>1,38</sup>.





**Figura 2.- Ciclo de Infección de Baculovirus.** La infección primaria se da cuando una larva de insecto ingiere (1) partículas de Polihedrina; el pH alcalino del intestino libera a los viriones ocultos –OV, que se fusionan<sup>1</sup> (2) a las células epiteliales del intestino mediado por la proteína p74. Los virus una vez en el citoplasma entran al núcleo celular a través de los poros nucleares (3). Dentro del núcleo se desensamblan y comienzan a expresarse genes virales. La replicación viral (4) en la fase tardía, genera nuevas partículas virales que geman de la célula infectada (6). Al salir éstos virus toman consigo parte de la membrana de la célula huésped, a estos virus se les conoce como virus gemados (7) o BV. Los virus gemados reinfectan células vecinas – infección secundaria- al ser introducidos a nuevas células por una endocitosis (8) mediada por la proteína de la cápside viral GP64 a través de receptores específicos<sup>4</sup>. Los virus endocitados escapan del endosoma tardío (9) para redirigirse al núcleo. En la fase "muy tardía" de infección, algunos viriones son ocluidos en Polihedra (10). Estos virus son los responsables de infectar un nuevo insecto.

La infección secundaria se da cuando estas primeras células del intestino infectadas producen virus gemados (BV) que infectan hematocitos<sup>47</sup>, las células del sistema hematopoyético que se distribuyen infectando el resto del insecto. Al principio los tejidos mayormente afectados son los ovarios, tejido graso y el sistema traqueal, pero finalmente todos los tejidos presentan síntomas de infección<sup>48,49</sup>.

Quizás el ejemplo más dramático de cómo el Baculovirus altera la larva a nivel fisiológico sea el que las células infectadas con AcMNPV secretan la proteína *egt*, una *UDP-glucosa/galactosa transferasa*<sup>50</sup> que inactiva las hormonas esteroides del insecto evitando así la maduración de las orugas en pupas y animales adultos<sup>51</sup>; con ello, el Baculovirus logra un máximo de eficiencia en la producción de partículas virales.



En la etapa final de la enfermedad, el insecto es literalmente licuado y convertido en un saco de líquido lechoso blanquecino que consiste principalmente en partículas virales y desechos celulares. Este fenotipo es el que fue descrito como enfermedad de "wilting" en los gusanos de seda en el siglo XIX y ahora es conocido como "melting" (del inglés "derretir"), lo cual ejemplifica de forma muy clara lo que le ocurre al insecto hacia el final de la infección por Baculovirus<sup>33</sup>.

En la típica infección de AcMNPV, más de un billón de viriones ocluidos son producidos en una sola oruga, lo que constituye el 10% del peso seco del insecto<sup>47</sup>. Finalmente las partículas ocluidas en Polhiedrina son liberadas al ambiente cuando el exoesqueleto de quitina del insecto se rompe.

## BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Una de las herramientas clave en el estudio de Baculovirus han sido las células Sf21 y Sf9. Estas líneas celulares fueron originalmente aisladas de larvas del insecto *Spodoptera frugiperda*<sup>52</sup> y tienen la característica de ser especialmente susceptibles a la infección de Baculovirus, ya que en el curso de algunos días las células son totalmente lisadas por los efectos citolíticos de la infección viral.

Muchos grupos de trabajo alrededor del mundo han aprovechado la sensibilidad de estas células a la infección por Baculovirus generando virus recombinantes que contengan genes de interés bajo el control de promotores virales fuertes<sup>53-55</sup>. Uno de los promotores más usados es el promotor de polhiedrina mencionado anteriormente. La introducción de un gen exógeno bajo el control de este promotor resulta en la producción de grandes cantidades de proteína exógena en las células infectadas por el virus recombinante<sup>56</sup>. Es tal la cantidad de proteína producida de esta manera que se facilitan enormemente las tareas de purificación y estudios funcionales posteriores. Muchas proteínas de distintos orígenes, incluyendo proteínas solubles<sup>55</sup> o membranales<sup>57</sup> han sido producidas con este método. El uso de este sistema de expresión tiene la ventaja de que el plegamiento de la proteína expresada y todas las modificaciones pos-traduccionales como glicosilación, fosforilación o cortes proteolíticos serán de tipo eucarionte. Una ventaja adicional es que las proteínas expresadas son funcionales en las células infectadas permitiendo su estudio *in vivo*. Un ejemplo de ello es la expresión y estudio de canales iónicos<sup>58</sup> o receptores acoplados a proteínas G<sup>59</sup>.

Más recientemente el Baculovirus ha sido usado como un vector de transferencia de material genético a células de mamífero<sup>60</sup>. Se ha demostrado que Baculovirus modificados genéticamente pueden expresar genes en células de mamíferos si estos se encuentran bajo los promotores adecuados<sup>61</sup>. El utilizar a un virus de insectos como vector de transferencia en mamíferos tiene la ventaja de ser un sistema no infectivo ni replicativo<sup>62</sup>.

Otro uso biotecnológico que se le ha dado a esta clase de virus es el despliegue de péptidos o incluso proteínas en su cápside. Distintos grupos han fusionado diversos péptidos a GP64 convirtiéndolo en una excelente opción para la identificación de ligandos y la presentación de antígenos<sup>63,64</sup>.



## CAPITULO II: RNA DE INTERFERENCIA.

### EL FENÓMENO DE RNA DE INTERFERENCIA.

El fenómeno de RNA de interferencia o RNAi consiste en la degradación específica de un RNA mensajero (mRNA) mediada por un RNA de doble hebra (dsRNA) de secuencia homóloga al mRNA. Esta degradación del mRNA es específica, dado que la degradación depende del apareamiento tipo Watson-Crick de una de las hebras del dsRNA (la cadena antisentido al mRNA) y la cadena sencilla del mRNA. El RNAi ha demostrado ser en extremo eficiente para eliminar de la célula un mRNA determinado, previniendo la síntesis de la proteína.

El fenómeno de RNAi se ha observado en gran variedad de organismos eucariontes, desde plantas<sup>65</sup> y hongos<sup>66</sup>, hasta insectos<sup>67</sup> y mamíferos<sup>68</sup>. Esto es en gran parte debido a que las proteínas involucradas en el RNAi están conservadas en todos estos organismos.

El primer organismo donde se describió el RNAi fue en la planta petunia con los trabajos pioneros del grupo de Richard Jorgensen en 1990<sup>69</sup>. Este grupo se encontraba trabajando con la sobreexpresión de genes que confieren pigmento a los pétalos de las flores de esta planta. Lo que Jorgensen describió es que al aumentar el número de copias de uno de estos genes, no se observaba un aumento en la pigmentación de los pétalos, sino por el contrario, el resultado era una total ausencia de color<sup>70,69,71</sup>. A este fenómeno se le llamo **cosupresión**. No sería sino muchos años después que se identificaría al dsRNA producido por la transcripción aberrante, resultado del exceso de copias de un gen, como el causante del fenómeno de cosupresión en plantas.

El trabajo clave en la historia del RNAi fue el realizado por Andrew Fire en 1998<sup>72</sup>. En este trabajo se identifica por primera vez al dsRNA como el responsable directo del fenómeno de interferencia en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Fue en este artículo también que se le dio el nombre de *RNAi* al fenómeno de silenciamiento mediado por dsRNA. Por otro lado, se definió al RNAi como un fenómeno de silenciamiento postranscripcional dado que eran únicamente las secuencias de dsRNA homólogas al mensajero las que lograban el efecto de interferencia y no así las moléculas de dsRNA homólogas a intrones o regiones promotoras. Otra de las características del RNAi en *C. elegans* era su sorprendente eficiencia para silenciar postranscripcionalmente la expresión de un gen: una cantidad mínima de dsRNA es suficiente para interferir un gen y el efecto de RNAi incluso es capaz de ser heredado a la filial uno. Estos resultados han sugerido que en el nematodo existe, además del fenómeno de interferencia, un efecto de amplificación<sup>73</sup>. Actualmente se tienen identificadas algunas RNA polimerasas dependientes de RNA en plantas<sup>74</sup> y en nemátodos<sup>75</sup> como las posibles responsables del fenómeno de amplificación.

## EL MECANISMO DEL RNAI.

Hay dos maneras de iniciar el fenómeno de RNAi, una es introduciendo de manera exógena el dsRNA al interior de la célula (transfecciones lipídicas, microinyecciones, electroporación, etc.) La otra manera de iniciar el RNAi es generando células o animales transgénicos que expresen, ya sea de manera estable o transitoria, algún tipo de dsRNA. – por ejemplo a partir de construcciones con promotores invertidos o expresión de estructuras tipo tallo-asa<sup>76</sup>.

Sea del origen que sea, el dsRNA una vez en el citosol es reconocido por una RNasa tipo III llamada Dicer<sup>77</sup>. Esta RNasa digiere el dsRNA en fragmentos de entre 19 y 24 nucleótidos aproximadamente<sup>78</sup>. Estos pequeños duplex de RNA son los responsables directos del fenómeno de interferencia. Actualmente se les conoce como siRNA del inglés “small interfering RNAs”. Una de las características de los siRNA además de su tamaño, es el corte característico que deja Dicer: en el extremo 5’ se conserva un fosfato y en el extremo 3’ dos o tres bases desapareadas<sup>79</sup>.

Los siRNAs, después de ser digeridos por Dicer, entran en un complejo multiproteico denominado RISC –del inglés “RNA Induced Silencing Complex”, el cual es responsable del apareamiento del dúplex siRNA-mRNA y de la posterior degradación de este último<sup>77</sup>.

Los componentes exactos o la función específica de algunos de los componentes de RISC no se han caracterizado del todo. Dentro de los integrantes del RISC que se tienen identificados se encuentra la proteína Argonauta o proteínas homólogas a ésta<sup>80</sup> (RDE-1 en *C. elegans*, QDE2 en *Neurospora crassa*, eIF2C en mamíferos). Argonauta y sus homólogos tienen un peso molecular cercano a los 100 kDa y todos presentan dominios denominados PAZ y PIWI caracterizados por un barril tipo beta aparentemente responsable de unir RNA de cadena sencilla y RNA de cadena doble<sup>81</sup>.

Otros de los componentes que han sido descritos como parte del RISC son una nucleasa llamada Tudor<sup>82</sup>, dos helicasas denominadas Gemin3 y Gemin4<sup>83</sup>, la proteína VIG<sup>84</sup>, y la “proteína relacionada al cromosoma X frágil” o FMRP<sup>84</sup>. Estas dos últimas son capaces de unir dsRNA al igual que Argonauta.

A pesar de que el papel específico que juega cada una de las proteínas asociadas al RISC es hasta ahora desconocido, hay fuertes evidencias de que el RISC se asocia a los ribosomas activos, es decir aquellos en los que la síntesis proteica está ocurriendo, sugiriendo que el proceso de RNAi ocurre en la cercanía de los ribosomas.

Una de las proteínas que aun no ha sido identificada en el RISC pero de cuya actividad se tiene evidencia es una endonucleasa denominada Slicer<sup>85</sup>, y cuya función sería la de cortar los heteroduplex que se forman entre los siRNA acoplados a RISC y el mRNA homólogo. Este corte ocurre exactamente entre el nucleótido diez y el nucleótido once del siRNA<sup>86,87</sup>. De esta manera sería Slicer la proteína específicamente responsable de la degradación del mRNA.



## EL PAPEL FISIOLÓGICO DEL RNAi.

Desde que en 1998 se identificó al dsRNA como el iniciador del fenómeno de RNAi, se ha avanzado enormemente en la comprensión de los mecanismos moleculares que llevan a la degradación del mRNA. Sin embargo, a pesar de todo este esfuerzo, poco se sabe acerca del verdadero papel fisiológico que la maquinaria del RNAi juega en algunos organismos.

### > Sistema de defensa contra Virus.

En un principio se pensó que el RNAi podría ser un eficiente sistema celular de defensa antiviral<sup>88,89</sup>. Específicamente en contra de los retrovirus que tienen un genoma de RNA de cadena doble o de cadena sencilla. Estos últimos, generan dsRNA como un intermediario en el proceso de duplicación de la información genética viral. En ambos casos la maquinaria de RNAi estaría detectando el dsRNA del virus y degradándolo por la acción de la RNasa Dicer para después ensamblar los complejos RISC que detendrían la síntesis de cualquier proteína viral, degradando los RNA mensajeros virales.

Una de las evidencias más sólidas que apoyan esta hipótesis es el hecho de que las plantas inhabilitadas genéticamente para llevar a cabo el RNAi son extremadamente susceptibles a infecciones virales<sup>90</sup>. Por su parte, algunos virus de plantas han desarrollado estrategias para interferir con el RNAi, generando proteínas capaces de inhibir uno o varios de los componentes de la maquinaria del RISC o en general del fenómeno de RNAi. Como ejemplo de esto está la proteína Hc-Pro del potyvirus *etch* de la planta del tabaco, que previene la acumulación de los siRNA<sup>91</sup>. Otro ejemplo es la proteína p38 del virus X de la papa (PVX) que interfiere con el RNAi sistémico en la planta<sup>92</sup>.

### > Regulación Epigenética.

Otro proceso con el que pudiera tener relación el RNAi es el silenciamiento transcripcional o la definición de regiones de heterocromatina en el genoma.

El silenciamiento transcripcional es un proceso altamente regulado que ocurre cuando las histonas de una región del genoma sufren modificaciones covalentes que las “marcan” indicándole a la maquinaria celular que esa región de DNA en específico no debe ser transcrita. Una de las modificaciones mejor caracterizadas que sufren las histonas es la metilación de la lisina 9 de la histona H3<sup>93</sup>. Esta metilación específica de un aminoácido parece ser una marca inequívoca del DNA en estado heterocromático, es decir, silenciado. El caso contrario es la metilación de lisina 4 de la misma histona H3, que se ha correlacionado con cromatina no condensada y con una alta tasa de transcripción<sup>94</sup>. Otra de las modificaciones de las que son blanco las histonas incluyen la fosforilación, cortes proteolíticos, ubiquitinación, acetilación y desacetilación<sup>95,96</sup>. Todas estas modificaciones ocurren en aminoácidos específicos, de tal manera que este sistema de “marcaje” funciona como una especie de código – el código de las histonas<sup>97</sup> – que la célula utiliza para definir que secuencias deben transcribirse, (eucromatina) y cuales, por el contrario, deben permanecer en un estado silenciado (heterocromatina). Las regiones del genoma que se encuentran en estado heterocromático son los telómeros (en los extremos de los cromosomas) los centrómeros (en el centro de los cromosomas) algunas regiones intergénicas y regiones con una gran cantidad de secuencias repetitivas<sup>98,99</sup>. Todas las



regiones heterocromáticas también presentan metilación del dinucleótido CG. La metilación del DNA también participa activamente en la definición de regiones heterocromáticas del genoma<sup>100</sup>.

El RNAi es, en principio y por definición, un fenómeno de silenciamiento postranscripcional<sup>72</sup>, ya que no afecta la transcripción de un gen sino la traducción del RNA mensajero en proteína. Sin embargo, evidencia experimental muy reciente apunta a que el fenómeno de RNAi, o por lo menos algunas de las proteínas involucradas en este fenómeno, pudieran también jugar un papel en el silenciamiento transcripcional.

El ejemplo más claro es en plantas, donde la introducción de RNA de doble hebra homólogo a secuencias reguladoras, por ejemplo promotores, resulta en la metilación de los mismos<sup>101,102</sup>. Esta metilación del promotor conlleva a un "apagado" del gen.

Las plantas es el único organismo donde se ha observado la metilación de secuencias genómicas mediada por dsRNA de manera directa. Plantas mutantes en alguna de las proteínas de la maquinaria del RNAi, y que por tanto son incapaces de llevar a cabo el fenómeno de silenciamiento postranscripcional, también presentan un incremento en la movilidad de transposones<sup>103</sup> además de esterilidad y problemas en el desarrollo<sup>104-106</sup>.

Por su parte, en el nemátodo *C. elegans* los animales con versiones no funcionales de mut-7 (una helicasa que se cree forma parte del RISC y es indispensable para el RNAi) también presentan un desilenciamiento de transposones en línea germinal<sup>107</sup>. Por su parte mutantes en Dicer y Argonauta también resultan en animales con fenotipos asociados al aumento en la movilidad de transposones e inestabilidad cromosómica<sup>108-110</sup>.

El caso más claro de la relación entre la maquinaria de RNAi y la metilación de las histonas es el de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. En este organismo, mutantes en Dicer, Argonauta y la RNA polimerasa dependiente de RNA (RPdR) presentan un desilenciamiento generalizado de transposones<sup>111</sup> y regiones centroméricas<sup>112</sup> acompañada de una pérdida en la metilación de la lisina 9 de la histona H3 conjuntamente con un aumento en la metilación de lisina 4<sup>113</sup>. Esta pérdida de regiones heterocromáticas va acompañada de la acumulación de dsRNA homólogo a regiones altamente repetidas del genoma<sup>114</sup>. Esta evidencia apunta a que la pérdida de la maquinaria de RNAi en esta levadura va acompañada de la pérdida de la capacidad para regular y silenciar parte del genoma. El modelo propuesto para explicar este fenómeno sugiere que las regiones altamente repetidas del genoma pueden generar dsRNA, el cual es procesado por la maquinaria del RNAi a siRNAs que en un complejo parecido a RISC (pero de localización nuclear) estaría dirigiendo a metilasas de Histonas y a DNA metil transferasas a las regiones homólogas al dsRNA<sup>114</sup>. Esta sería una elegante explicación a como una célula define que regiones deben ser silenciadas y cuales no. En genomas tan grandes y tan complejos como los eucariontes sería imposible tener enzimas que reconocieran de manera secuencia-específica que regiones deben heterocromatinizarse. Que el dsRNA sea el responsable de definir estas regiones parece ser una solución lógica y simple a este complejo problema.

Sin embargo, probar esta hipótesis en mamíferos ha sido una tarea más complicada de lo que originalmente se pensó. Hasta la fecha se define al RNAi en mamíferos como un fenómeno de silenciamiento postranscripcional y no se tienen reportes de que el dsRNA pueda provocar un silenciamiento pre-transcripcional de algún gen.



## > Micro RNAs.

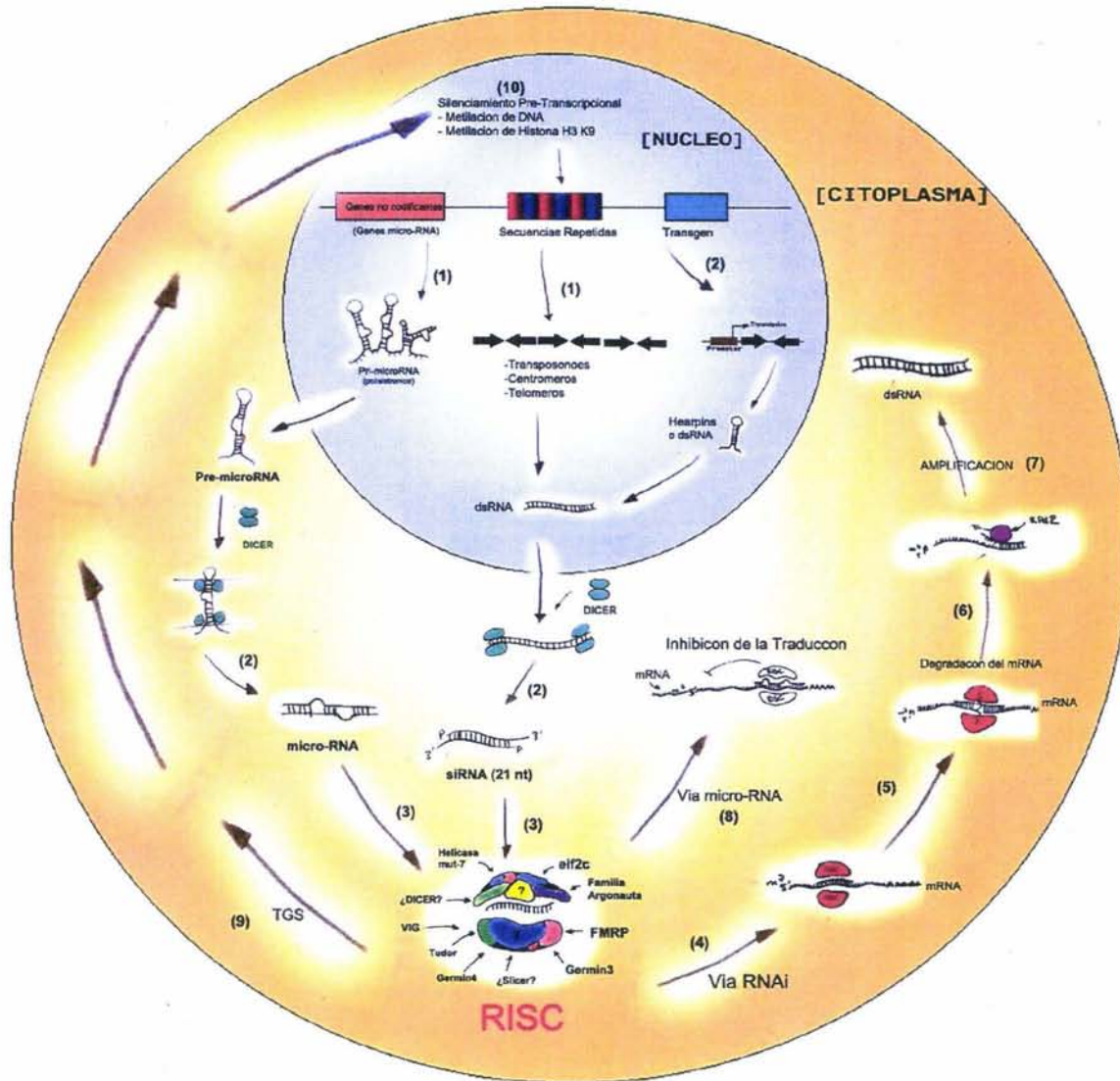
Sea cual fuere el papel fisiológico del RNAi, es claro que este fenómeno no ha evolucionado para satisfacción de científicos interesados en silenciar genes para entender diversos fenómenos biológicos. Para entender cual podría ser uno de los papeles del RNAi en animales, sería necesario primero saber en que condiciones las células producen RNA de doble hebra.

En mamíferos los dsRNA más abundantes son los llamados micro RNAs. Los micro RNAs son RNAs de doble hebra de aproximadamente 21 nucleótidos en su forma madura<sup>85</sup>, muy parecidos a los siRNAs mediadores del RNAi<sup>115</sup>. Los precursores de los micro RNAs (pre-miRNA) son moléculas de dsRNA de aproximadamente 80 nt que forman estructuras tallo-asa imperfectas<sup>116</sup>. Los pre-miRNAs son reconocidos y cortados por Dicer, la misma enzima que procesa y da origen a los siRNA del RNAi<sup>115,116</sup>. Estas formas maduras de micro RNAs se ensamblan en un complejo multiproteico denominado miRNP por "micro RNA Ribonuclear Complex"<sup>83</sup>. Este miRNP es muy parecido al RISC y de hecho comparten a varias de las proteínas como Argonauta y helicasas. Los complejos miRNA-miRNP se aparean de manera imperfecta a regiones 3' UTR no traducidas de mRNA blanco<sup>117</sup>. Este apareamiento imperfecto resulta en una inhibición de la traducción de ese mensajero en específico. Aparentemente es el apareamiento imperfecto el que determina que la traducción del mRNA se inhiba y no sea degradado como ocurre en el fenómeno de RNAi y los siRNA, en donde el apareamiento del siRNA con el mRNA es perfecto.

Los micro RNAs han demostrado jugar un papel importante en la regulación de procesos de desarrollo y diferenciación en distintos organismos<sup>118</sup>. Por ejemplo en *C.elegans* los micro RNAs let-7 y lin-4 regulan el paso de una etapa larvaria a otra<sup>119</sup>. En *Drosophila* el micro RNA "Bantam" está involucrado en procesos de diferenciación y proliferación celular en etapas embrionarias<sup>120</sup>. Otros micro RNAs están involucrados en el desarrollo morfogénico de plantas<sup>121</sup>.

En mamíferos se han identificado una gran cantidad de micro RNAs con posibles genes blancos que podrían estar relacionados a desarrollo<sup>122</sup>. También hay fuerte evidencia de que la expresión de los distintos micro RNAs de mamífero es específica al tipo celular y etapa del desarrollo<sup>123,124</sup>.

Es sorprendente que, a pesar de que algunos autores habían imaginado una regulación génica sobre la base de RNA hace ya más de 30 años<sup>125</sup> el fenómeno de silenciamiento postranscripcional mediado por dsRNA no halla sido descubierto hasta años recientes. Sin duda aun hace falta mucho trabajo para esclarecer todos los detalles del fenómeno de RNAi y sobretodo el papel fisiológico que este juega en los distintos organismos. En la figura 3 se ejemplifican las distintas vías de silenciamiento mediadas por el dsRNA.



**Figura3.- Silenciamiento mediado por dsRNA.** El dsRNA puede ser transfectado en la célula o generarse de manera endógena (1) por secuencias repetidas en el genoma, genes de micrRNAs o transgenes. El dsRNA es exportado al citoplasma donde la RNasa Dicer lo reconoce y procesa (2) en fragmentos de 21 nucleótidos (siRNA). Estos se ensamblan (3) en un complejo multiprotéico denominado RISC. En la vía de RNAi (4) el complejo siRNA-RISC es responsable de identificar RNA mensajeros homólogos y degradarlos (5). En algunos organismos como plantas y *C. elegans*, una RNA polimerasa dependiente de dsRNA (6) usa como templado el complejo siRNA-mRNA para genera más dsRNA lo que amplifica el fenómeno al generar nuevo dsRNA (7). En el caso de micro RNAs (8) el apareamiento imperfecto entre el complejo RISC-siRNA y la región 3'UTR del mensajero blanco inducen una represión de la traducción. La vía menos estudiada es la del silenciamiento transcripcional (TGS) mediado por dsRNA (9), donde los siRNA dirigen la (10) heterocromatinización de regiones homólogas en el genoma.



## TECNOLOGÍA CON BASE EN RNAi; APLICACIONES Y TERAPÉUTICA

Los proyectos de mega secuenciación de genomas completos sin duda han contribuido al entendimiento de los procesos biológicos a nivel molecular. Sin embargo, a pesar del enorme esfuerzo que representa secuenciar un genoma, caracterizar la función de cada proteína codificada es un esfuerzo que aun no ha concluido y que requiere de otro tipo de metodologías que puedan ser aplicadas de forma sistemática y masiva.

Eliminar un gen por recombinación homóloga es quizás el camino más directo para conocer y entender la función de una proteína determinada. No obstante, en distintos organismos, especialmente en mamíferos, es una metodología lenta y tecnológicamente demandante, en la que no siempre se obtienen los resultados esperados. Por otro lado las aproximaciones antisentido, las ribosimas o la expresión de mutantes negativas no han funcionado como se esperaba.

El descubrimiento del RNAi o silenciamiento postranscripcional mediado por dsRNA a complementado los proyectos de mega secuenciación revolucionado la manera en la que los experimentadores estudian la función de cada proteína. El RNAi permite silenciar la expresión de un gen de manera rápida, altamente específica y con una eficiencia sorprendente. A esto se le suma el relativo bajo costo del RNAi en comparación a las demás metodologías.

Actualmente se han desarrollado distintas estrategias para iniciar el fenómeno de RNAi en varios organismos<sup>76</sup>. Por ejemplo en *C. elegans*, la inyección de dsRNA en diferentes partes del gusano es una practica cotidiana para interferir un gen<sup>72</sup>. Otra estrategia en el nemátodo es alimentarlo con bacterias *E. coli* transformantes que expresan un dsRNA determinado<sup>126</sup>. Actualmente se cuenta con bibliotecas de más de 16,000 cepas diferentes de bacterias que expresan distintos dsRNA lo que cubre el 86% de los marcos de lectura abiertos del genoma del gusano<sup>127</sup>. Este tipo de trabajos han llevado a algunos autores de hablar del "RNAi geonómico" ya que actualmente, con la disponibilidad de las secuencias de todos los genes de un organismo, es virtualmente posible silenciar a todos y cada uno de ellos de manera independiente y casi automatizada<sup>65,128</sup>.

En células de mamífero, la introducción de dsRNA mayor a 30 pares de bases desencadena una respuesta tipo antiviral parecida a la que induce el interferón:<sup>129,130</sup> el dsRNA activa a la proteína cinasa R (PKR) que a su vez activa a la RNasa L, la cual degrada de manera inespecífica todos los RNA mensajeros de la célula. Al final, no solo hay una inhibición de la síntesis protéica generalizada, sino que la célula entra en apoptosis y muere.

Para evitar esta respuesta inespecífica del dsRNA, en células de mamíferos se utilizan fragmentos de 21 nucleótidos (siRNAs) con extremos 5' fosforilados y 2 o 3 bases desapareadas en el extremo 3'<sup>68</sup>. Esta estructura asemeja a los productos generados por la RNasa Dicer y no activan a PKR. Los siRNA pueden ser sintetizados químicamente o ser generados a partir de dsRNA digeridos con la enzima recombinante Dicer *in vitro*. Posteriormente, estos siRNA son microinyectados o transfectados en las células para iniciar el RNAi.



Un hecho importante es que, si estos 21 nucleótidos de un siRNA comparten homología con varias proteínas, todas ellas serán silenciadas por igual. No obstante, el encontrar 21 nucleótidos que sean específicos para un mensajero en particular no es algo imposible: 21 nucleótidos con cuatro combinatorias (A, C, T, G) nos da un número de 194,481 combinaciones diferentes. Se estima que en el genoma humano hay unos 35,000 genes, por lo que encontrar un siRNA específico para cada uno no parece ser complicado. Este hecho incluso abre la posibilidad de inhibir de manera específica isoformas de un gen o a versiones mutadas de éste.

Respecto al diseño de los siRNA hay que tener en cuenta que no todas las secuencias son igualmente efectivas para interferir el mismo RNA mensajero: los siRNA diseñados homólogos a regiones donde el mRNA presenta estructuras secundarias complejas o que son blanco de reconocimiento de otras proteínas suelen tener menor eficiencia<sup>76</sup>. Hacen falta ensayos tipo “prueba y error” para identificar las regiones más susceptibles a la degradación vía dsRNA.

Otros grupos han desarrollado sistemas de expresión basándose en plásmidos que dirigen la expresión intracelular de dsRNA bajo promotores de Polimerasa II<sup>131</sup>, o siRNA, o estructuras tallo-asa, dirigidas por promotores de la RNA Polimerasa III<sup>76,132</sup>.

Recientemente también se han desarrollado vectores de transferencia génica basada en el uso de virus para interferir genes con RNAi. Por ejemplo lentivirus han sido modificados genéticamente para expresar un siRNA homólogo a CD25 en las células transducidas<sup>133</sup>. Los linfocitos T tratados con este lentivirus redujeron la cantidad de CD25 en su superficie y hubo una marcada disminución en su proliferación mediada por IL-2. Estos tipos de virus han sido muy útiles en líneas celulares o cultivos primarios difíciles de transfectar.

Otro campo en el que las tecnologías basadas en el uso del RNAi han tenido un gran impacto es en la generación de animales transgénicos. Células totipotenciales obtenidas de embriones de ratón (ES) infectadas con virus o transfectadas con construcciones para generar siRNA han sido utilizadas para generar animales transgénicos que expresan un siRNA y por lo tanto presentan el fenotipo de la ausencia de proteína para la cual es homólogo. Ejemplo de esto es la generación de un ratón “knock down” (RNAi) para la enzima DNA-N-glicosilasa<sup>134</sup>. Este animal incluso fue capaz de heredar el efecto de silenciamiento a su prole.

En el caso de mamíferos los resultados más impresionantes en la inhibición de un gen en animales adultos mediante RNAi se han logrado inyectando siRNA acoplados a lípidos al torrente sanguíneo<sup>135</sup> o por medio del método hidrodinámico. Esta última técnica consiste en inyectar de manera intravenosa a los siRNAs en un volumen igual a la mitad del volumen sanguíneo del animal de forma extremadamente veloz (de 7 a 10 segundos), lográndose una transfección y distribución sistémica de los siRNA. Con esta metodología se ha interferido eficientemente la expresión del gen *FAS*<sup>136</sup> o el transgen de Luciferasa en ratones adultos<sup>137</sup>.

Desde sus inicios, se propuso que el RNAi podría ser una herramienta terapéutica en el tratamiento de distintas patologías donde la sobreexpresión de un gen o la presencia de la versión mutada de una proteína son las causantes de la enfermedad.

Por ejemplo, en la enfermedad neurodegenerativa Alzheimer, el exceso de la proteína beta-amiloide (BA) está relacionado a una degeneración de ciertas partes del sistema



nervioso central. A este respecto algunos grupos han usado siRNA para inhibir una de las proteínas clave en la síntesis del BA en cultivo primario neuronal<sup>138</sup>, resultando en una considerable reducción de los niveles de esta proteína, acompañado de una disminución en la citotoxicidad.

Por otro lado, en distintos tipos de cáncer se presentan versiones mutadas de proteínas que inducen una proliferación excesiva, estos llamados oncogenes han sido por años el blanco terapéutico en distintos cánceres. La posibilidad de interferir la traducción de las versiones mutadas de oncogenes, dejando intactas las versiones funcionales, es el objetivo final de todo diseño de drogas antineoplásicas. Trabajos *in vitro* han demostrado que los siRNA podrían ser la mejor droga de diseño que uno pudiera imaginar. La posibilidad de encontrar una secuencia de 21 nucleótidos que sea específica para cada oncogen pero que no interfiera con las versiones silvestres es una posibilidad real. A este respecto Brummelkamp et al<sup>139</sup> lograron la interferencia específica del oncogen RAS-v12 mediante un lentivirus modificado que expresa un siRNA homólogo al gen mutado. El oncogen Ras-V12 tiene una mutación puntual en el codón "GGA" (Glicina) que lo convierte en "GTA" (Valina). El cambio de este aminoácido resulta en una versión hiper-activa de la proteína que conlleva a una proliferación excesiva. El uso de este lentivirus inhibió al oncogen Ras-V12 pero no afectó la expresión del gen silvestre [Ras-G12]. Este trabajo se suma a los de la interferencia del oncogen bcr-abl<sup>140</sup>, E6, E7<sup>141</sup> entre otros y es sólo un ejemplo de la especificidad y alcance que el RNAi pudiera tener en el combate del cáncer.

Otro campo en el que el RNAi ha tenido un fuerte impacto es la Virología. Trabajos recientes han logrado inhibir la expresión de proteínas virales de manera eficiente y específica e incluso se ha logrado una disminución de la infectividad o de la carga viral, resultado de una inhibición del proceso de infección.

Ejemplo de ello es la interferencia de la proteína p24 de la cápside viral del VIH<sup>142</sup> o las proteínas reguladoras Rev y Tat del mismo virus<sup>143</sup>. Otras proteínas virales que también han sido interferidas con RNAi son la RNAP del virus de la Polio<sup>144</sup>, las proteínas E6 y E7 de Papilomavirus<sup>145</sup> o la proteína 5B del Virus de Hepatitis C<sup>146</sup>.

Aunque los resultados obtenidos en la inhibición de genes involucrados en enfermedades virales con metodologías basadas en el uso de RNAi son alentadores, en la práctica, aun falta mucho por hacer para desarrollar terapias basadas en el dsRNA. Uno de los principales problemas es la vía de administración. Hoy en día, los vectores virales disponibles o el "método hidrodinámico" no son una opción terapéutica real en humanos.

En este sentido, el trabajo de tesis presentado aquí, demuestra por primera vez la inhibición de la infección *in vitro* e *in vivo* de un virus animal altamente citolítico y citotóxico, mediante el uso de dsRNA homólogo a mRNAs virales esenciales para la infectividad del virus. De esta manera, este trabajo es pionero en el campo del RNAi y la virología, al demostrar que la aplicación sistémica de dsRNA puede prevenir infecciones virales en animales vivos.



## OBJETIVO | JUSTIFICACIÓN

---

Actualmente existe una fuerte evidencia experimental que apoya y valida el uso de RNA de doble hebra para interferir con la expresión de genes virales vía RNAi. No obstante, aun hacen falta más experimentos para demostrar su factibilidad como una herramienta terapéutica en el combate de infecciones virales *in vivo*.

Al momento de realizar este trabajo no se contaba con evidencia alguna de que el RNAi funcionara para inhibir la expresión de genes virales. Por esta razón nos propusimos generar un modelo para probar el concepto de que la inhibición de genes virales mediante RNAi permitiría interferir con el curso de una infección viral por Baculovirus.

Por otro lado, proponemos que el uso de RNAi representa una alternativa viable al uso de la genética reversa clásica, la cual es mucho más difícil y tardada de implementar en virus de genomas tan complejos como el de Baculovirus.

## HIPÓTESIS

---

- El RNAi permite la inhibición de la expresión de genes estructurales y no estructurales en Baculovirus.
- Es posible utilizar RNAi en Baculovirus como una alternativa a la genética reversa clásica.
- La introducción de dsRNA con secuencias homólogas a genes esenciales para la virulencia de Baculovirus inhibirán la infección *in vitro* e *in vivo* de este virus.

## METODOLOGÍA

---

### Cultivo celular de Células Sf21.

La línea celular Sf21 fue comprada de la compañía Invitrogen. Las células fueron cultivadas a 27°C en medio de insecto Grace suplementado con 3.3 g/l de lactoalbumina hidrolisada, 3.3 g/l de yeastolate, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor. Para los cultivos líquidos además se agregó 0.1% de ácido plurónico como surfactante.

### Producción del Baculovirus Recombinante AcMNPV-GFP

El cDNA de la proteína fluorescente verde (GFP) se obtuvo del plásmido comercial pEGFP-N1 para ser clonado en el vector pBlueBac4 bajo el control del promotor de polihedrina. La construcción pBB4-GFP fue cotransfectada en células de insecto Sf21 junto con DNA linealizado del virus AcMNPV. De esta manera ocurre un evento de recombinación entre el DNA viral y el plásmido pBlueBac4-GFP obteniéndose virus recombinantes que expresan GFP en las células infectadas.

### Síntesis de dsRNA.

**dsRNA-gp64:** los nucleótidos 109,330 a 109,949 del genoma de AcMNPV fueron amplificados por PCR. Esta secuencia corresponde a los primeros 619 nucleótidos del gen viral gp64. Una vez corroborada la secuencia, fue clonada en el sitio múltiple de clonación del plásmido pPD129.36 el cual está flanqueado por dos promotores invertidos de la polimerasa T7. La secuencia de los promotores de T7 y el fragmento del gen fueron amplificados por PCR usando oligos universales de T7. (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3') El producto de PCR se usó como templado para la transcripción *in vitro* usando a la Polimerasa T7 y ribonucleótidos. El dsRNA así obtenido fue tratado con DNasa I previo a una extracción con una solución Fenol-cloroformo 1:1 para eliminar cualquier rastro del templado de DNA. Para favorecer la formación del RNA de doble hebra, el RNA fue calentado a 95 °C y luego dejado enfriar a temperatura ambiente. Por último se corroboró la integridad del dsRNA sometiendo una muestra a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio.

**dsRNA-GFP:** para la producción de dsRNA de GFP se siguió un protocolo idéntico al utilizado para gp64 excepto que en este caso se clonó el gen completo gfp (pEGFP-N1) en el plásmido pPD129.36 - aproximadamente 700 nucleótidos. Una estrategia similar se usó para el promotor de polihedrina.

**dsRNA-ie1:** para producir dsRNA homólogo a ie1 se utilizó la secuencia que va del nucleótido 19 al 470 del gen ie1 - correspondiente a la región amino terminal de la proteína (el codón de inicio ATG está en la posición número uno). Una vez clonado este fragmento en el plásmido pPD129.36 se siguió una estrategia idéntica a la de los otros genes para producir el dsRNA.

Para la producción de RNA de cadena sencilla se usó el plásmido pPD129.36 como templado en vez del producto de PCR. Para evitar la doble transcripción de los dos promotores T7 el plásmido fue previamente linealizado con la enzima de restricción HindIII



que corta antes del segundo promotor T7. Para obtener la cadena complementaria, el plásmido fue linearizado con NotI que corta después del primer promotor T7.

### **Purificación de dsRNA con Fenol:Cloroformo.**

Para purificar el RNA con fenol, se agrega agua tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen de 400  $\mu$ l seguido de 40  $\mu$ l de Acetato de Amonio 5M. Posteriormente se agregan 400  $\mu$ l de una mezcla 1:1 de cloroformo y fenol saturado con buffer ácido. A continuación se mezcla por *vortex* la muestra durante 1 minuto a máxima potencia. Seguidamente se centrifuga a máxima velocidad por 2 minutos. Se toma la fase acuosa (superior) y se pasa a un tubo nuevo al cual se agrega 1 volumen (400  $\mu$ l) de cloroformo. Ésta se mezcla por *vortex* nuevamente y es sometida a centrifugación por 1 minuto a máxima velocidad. Se toma la fase acuosa (superior) y se pasa a un tubo nuevo al cual se le agrega 1 Volumen de alcohol Isoamílico y 1  $\mu$ l de glucógeno (2 mg/ml). Esta muestra se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un periodo de al menos media hora al cabo de la cual se centrifuga a máxima velocidad por 10 minutos. El botón obtenido después de este paso es lavado dos veces con etanol al 70% en agua tratada con DEPC y resuspendido finalmente en agua tratada con DEPC.

### **Transfección del dsRNA.**

Para cuantificar la concentración del dsRNA se empleó un espectrofotómetro utilizando la siguiente ecuación:

$$(\text{Abs. } 280 \text{ nm}) \times 45 \times \text{Factor de Dilución}/1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l de dsRNA}$$

Para realizar las transfecciones se utilizaron 5  $\mu$ g de dsRNA por cada millón de células de insecto. El dsRNA fue incubado durante 40 minutos con una solución del lípido Cellfectin<sup>TM</sup> (0.5 mg/ml). Esta mezcla fue después añadida a un millón de células en suspensión en medio Grace sin suero fetal bovino. Se permitió que la transfección ocurriera a  $27^{\circ}\text{C}$  por un periodo de entre 12 y 16 horas al cabo de las cuales se agregó un volumen igual de medio Grace con 20% de suero fetal bovino. Las células así transfectadas se dejaron por 48 horas más a  $27^{\circ}\text{C}$  para permitir que éstas se dividieran y recuperasen de la transfección antes de ser utilizadas.

### **Producción de siRNAs.**

Para la generación de siRNA se utilizó la enzima recombinante Dicer humana del kit de la compañía *Human Therapy Systems* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: 1  $\mu$ g de dsRNA sintetizado *in vitro* se incubó toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  con la enzima Dicer humana. Los siRNA así producidos fueron transfectados (previa purificación mediante una extracción Fenol-Cloroformo) de la misma manera en que se transfectó el dsRNA. Para verificar la eficiencia del corte de la enzima, se analizó una reacción de digestión en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% verificándose la presencia de fragmentos de 21 nucleótidos.

## Microscopía Confocal.

Las células Sf21 transfectadas con dsRNA y luego infectadas con AcMNPV-GFP fueron fijadas 48 horas post-infección con una solución fría de paraformaldehído al 3% durante 30 minutos. El anticuerpo primario utilizado para detectar GP64 fue el AcV5 de *eBiosciences*, y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón acoplado a Rodamina. Para la detección de GP64 se excitó la rodamina con una longitud de onda de 570 nm y la emisión fue colectada a 590 nm - canal Rojo. Para detectar la proteína GFP presente en las células infectadas con AcMNPV-GFP se excitaron las células a 395 nm y para detectar la emisión se usó el filtro de 540nm - canal Verde. El doble marcaje fue observado en Amarillo resultado de la combinación del canal Verde (GFP) y el canal Rojo (GP64)

## Ensayos de $\beta$ -galactosidasa

Células Sf21 transfectadas con dsRNA y luego infectadas con AcMNPV-GFP fueron centrifugadas durante 30 segundos a 16,000 rcf. Las células así obtenidas fueron lisadas en 0.05 ml del buffer "*Reporter lysis buffer*" de Promega. Para detectar y cuantificar la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se empleó el sustrato *o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside* (ONPG) que al ser hidrolizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa da como resultado un producto de color amarillo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 405 nanómetros.

Las reacciones fueron hechas por triplicado en placas de 96 pozos agregando 0.2 ml de una solución de ONPG (4 mg/ml) a 20  $\mu$ l de lisado celular. La reacción se incubó a 37 °C por 30 minutos al cabo de los cuales se agregaron 0.05 ml de una solución de bicarbonato de Sodio 1M para detener la reacción. La absorbancia a 405 nm fue cuantificada en un lector de placas de ELISA. Para determinar las unidades (U) de  $\beta$ -galactosidasa se usó la siguiente ecuación:

$$U \text{ de } \beta\text{-gal por mg de proteína} = (\text{Abs. } 405\text{nm} \times 1.7) / (0.0045 \times \text{Tiempo} \times \text{mg/ml de proteína} \times \text{ml de lisado utilizado})$$

Para cuantificar el *blanco* se usó lisado de células Sf21 no infectadas.

## Ensayos de Placa y determinación del título viral

Para realizar los ensayos de placa y determinar el título viral de los sobrenadantes de las células Sf21 transfectadas con dsRNA y luego infectadas con AcMNPV-GFP se utilizaron placas de cultivo de 6 pozos. En cada una de ellas se sembraron dos millones de células Sf21 por pozo. Se permitió que las células se adhirieran por 30 minutos al cabo de los cuales fueron infectadas con diluciones seriales hechas a partir del sobrenadante de células infectadas con AcMNPV-GFP. Se permitió que la infección ocurriera por un periodo de 1 hora a 27 °C después del cual se aspiró el sobrenadante y se lavó a las células con 1 ml de medio Grace. Por último se agregaron 2 ml de medio Grace 10% SFB, 1.5% de agarosa de bajo punto de fusión y 1 ml de medio Grace 10% SFB una vez solidificada la agarosa.

Las células fueron monitoreadas para la aparición de placas GFP positivas durante las siguientes 72 horas. Las unidades formadoras de placas por mililitro (pfu/ml) fueron



calculadas multiplicando el número de placas positivas a GFP observadas por el recíproco de la dilución.

Todos los ensayos en que se determinaron las unidades formadoras de placas fueron hechos por triplicado.

Para infectar las célula a una Multiplicidad de Infección (MOI) determinada se usó la siguiente formula:

$$\frac{(\text{MOI deseada}) \times (\# \text{ de Células})}{\text{Titulo viral (pfu/mL)}} = \text{ml de stock viral a utilizar}$$

### RT-PCR semicuantitativo.

El RNA total de las células transfectadas con dsRNA y luego infectadas con AcMNPV-GFP se purifico utilizando el reactivo TRIZol de la compañía Invitrogen. El RNA así obtenido fue cuantificado espectrofotometricamente y una muestra fue sometida a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en agua tratada con DEPC para corroborar la calidad e integridad del RNA.

Para evitar la contaminación con DNA de las muestras, 5 µg del RNA total fueron tratados con 15 unidades de DNasa I (Libre de RNasa) por 20 minutos a 37°C. Después de la digestión con DNasa I las muestras fueron purificadas con una solución 1:1 de Fenol-cloroformo.

Para la retrotranscripción del RNA en cDNA y la reacción de PCR se utilizó el kit de Invitrogen *SuperScrip™ One Step RT-PCR system*. Este kit tiene la característica que la reacción de retrotranscripción y amplificación ocurren en el mismo tubo de manera secuencial.

Para cada reacción de RT-PCR, 200 ng de RNA total (tratado con DNasa I) fueron usados en reacciones de 50 µl. La concentración de los oligos utilizados fue de 0.2 µM.

A continuación se presenta una lista de los Oligos:

Gen	Oligo Forward	Oligo Reverse
<b>β-Actina</b>	5'-GATATGGAGAAGATCTGGCACCAC-3'	5'-TGGGGCAGGGCGTATCC-3'
<b>gp64</b>	5'-GAAAACAGTCGTCGCTGTCA-3'	5'-TATAGTCGACGAGCACTGCAACGCGCAAATG-3'
<b>ie1</b>	5'-GCGCCGTATTTAATGCGTTT-3'	5'-GAGGAATTTCTATGCCGGTTTC-3'
<b>gfp</b>	5'-ATATCCC GGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'	5'-GCTCGTCGACCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

El programa de RT-PCR utilizado es como a continuación se describe:

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción.	50°C	30 minutos	1
Desnaturalización Inicial.	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	15 segundos	21
Annealing	55°C	30 segundos	
Extensión	72°C	50 segundos	
Extensión final	72°C	2 minutos	1

Para asegurar que no hubiera contaminación con DNA en las reacciones de RT-PCR, controles en los que no se incluyó la transcriptasa reversa fueron hechos. En ningún caso se obtuvieron bandas.

En todos los casos 15  $\mu$ l de la reacción de RT-PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Los geles fueron después teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.25  $\mu$ g/ml) y analizados en un equipo *Typhoon 8600 Imager* después de desteñir el exceso de bromuro de etidio.

## **Microscopía Electrónica**

**Células:** Células Sf21 transfectadas con dsRNA y luego infectadas con AcMNPV-GFP o células sin infectar (control negativo) fueron fijadas con una solución de glutaraldehído en buffer salino por 2 horas a temperatura ambiente.

Las células fijadas fueron después sometidas a las técnicas estándar de microscopía electrónica de tinción negativa.

**Virus:** El sobrenadante de células infectadas fue centrifugado por 10 minutos a 16,000 rcf para eliminar desechos celulares. Posteriormente se agregó un volumen igual de polietilenglicol al 20% en 1M de NaCl al sobrenadante clarificado. El sobrenadante con PEG fue centrifugado de nuevo por 10 minutos a 16,000 rcf obteniéndose un botón que fue lavado con agua bidestilada dos veces. El botón fue finalmente resuspendido solución salina.

Los virus purificados de esta forma fueron después sometidos a las técnicas estándar de microscopía electrónica de tinción negativa.

## **Infección de larvas de *Tenebrio molitor***

Larvas de *Tenebrio molitor* fueron compradas en una tienda de mascotas local. Para infectar las larvas con Baculovirus AcMNPV-GFP éstas fueron inyectada en la hemolinfa con 2  $\mu$ l del mismo stock viral usado en los experimentos de infección de células Sf21 (título de  $1 \times 10^7$  pfu/ml).

De la misma manera 0.5  $\mu$ g de dsRNA fue inyectado en la hemolinfa de algunas larvas previa infección.

Para determinar la presencia de GFP en las lavas infectadas se empleó microscopía confocal usando el objetivo de menor amplificación (10X). A las larvas muertas se les inyectó también 2  $\mu$ l de una solución de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactósido) al 0.05% en DMSO. El X-Gal es degradado por la  $\beta$ -galactosidasa en un compuesto de color azul fácilmente identificable.

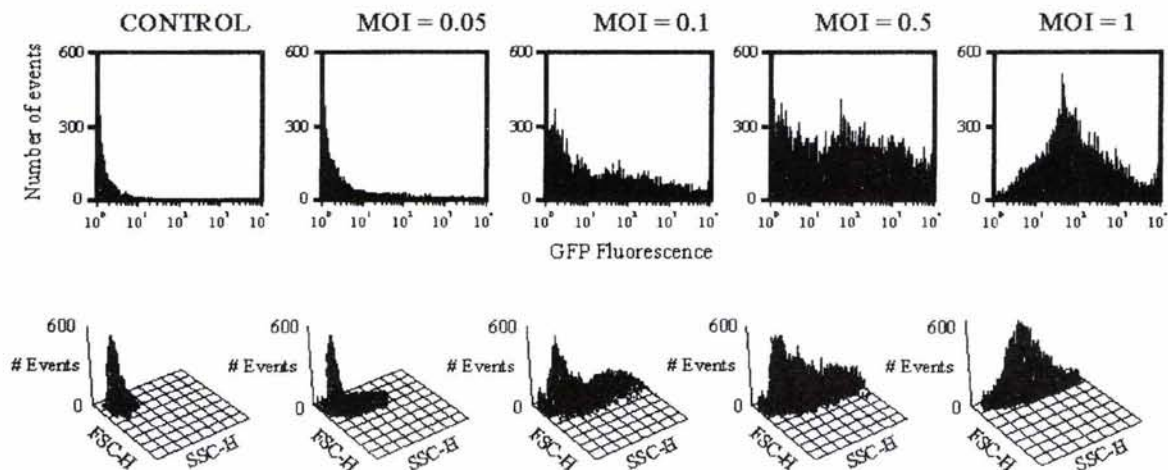


## RESULTADOS

### Las células Sf21 infectadas con AcMNPV-GFP expresan la proteína fluorescente verde.

Células Sf21 fueron infectadas a distintas multiplicidades de infección (MOI) de AcMNPV-GFP. Para evaluar el grado de infección, la cantidad de células expresando GFP fue cuantificada usando citometría de flujo 72 horas post-infección. En la figura 4 se observan los resultados obtenidos de este experimento. Como puede observarse, hay un corrimiento logarítmico de la fluorescencia del canal verde conforme aumenta la MOI, es decir, mayor es el número de células expresando GFP.

Otro marcador de infección que pudo ser observado usando citometría de flujo es el grado de complejidad de las células. En el panel inferior de la Figura 4 se muestran las gráficas de la “desviación frontal de luz” (FSC-H) contra la “desviación lateral de luz” (SSC-H).



**Figura 4.- Citometría de Flujo** de células de insecto Sf21 infectadas a distintas MOI de AcMNPV-GFP. En el panel superior se muestra el corrimiento de la fluorescencia del canal verde conforme aumenta la MOI. Esto es directamente proporcional a la infección de AcMNPV-GFP. En el panel inferior se ve la relación entre “dispersión frontal de luz” (FSC-H) y “dispersión lateral de luz (SSC-H) de las células infectadas. En ésta se observa un corrimiento de la SSC-H conforme es mayor la infección por Baculovirus

La dispersión frontal de luz es un parámetro directamente proporcional al tamaño de las células. Como puede verse éste es relativamente homogéneo en las células Sf21 ya sea que estén o no infectadas. La desviación lateral de luz por su lado es una medida compleja que refleja varios factores, entre los que se cuentan la rugosidad de la superficie celular, la densidad citosólica, y otros factores poco explorados.

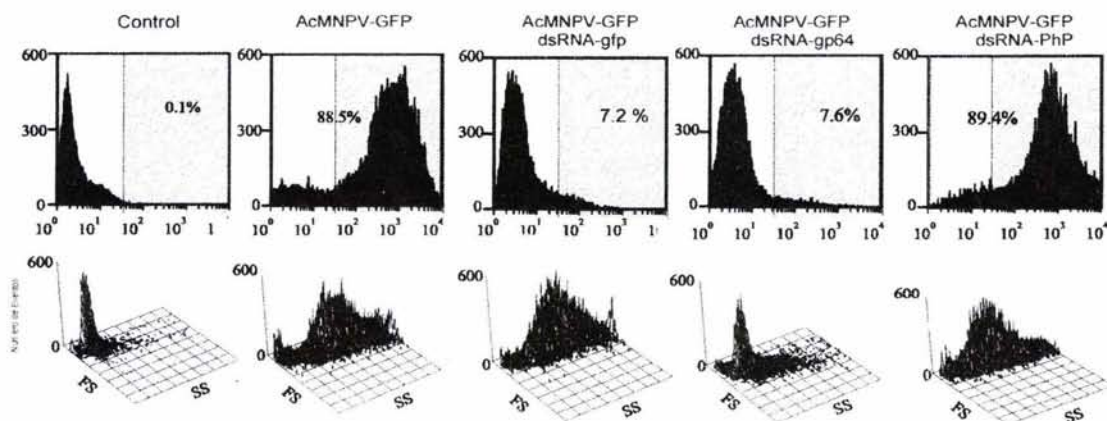
Como puede verse la “complejidad” de la dispersión lateral de las células también aumenta conforme aumenta la MOI. Ésto debido, muy posiblemente, a los cambios morfológicos antes descritos que sufren las células durante la infección por Baculovirus.

**La transfección de las células de insecto con dsRNA homólogo a gp64 o gfp inhibe la producción de GP64 y GFP de células infectadas a baja MOI (0.05)**

Para probar la hipótesis de que el RNAi puede ser usado para inhibir la expresión específica de genes virales, células Sf21 fueron transfectadas con dsRNA homólogo a la proteína de la cápside viral GP64 o a la proteína fluorescente verde (GFP). La glicoproteína GP64 es un componente de la cápside de los virus gemados y ha sido relacionada directamente a la infectividad de Baculovirus<sup>13</sup>.

Las células transfectadas con los distintos dsRNA fueron infectadas a una MOI de 0.05 con el virus AcMNPV-GFP 48 horas después de la transfección. La figura 5 muestra la cantidad de células verdes cuantificada mediante citometría de flujo al cabo de 96 horas post-infección.

Como se puede ver en la figura 5, la transfección de las células Sf21 con dsRNA homólogo a gfp (dsRNA-gfp) fue capaz de interferir con la fluorescencia en el canal verde, lo que se relaciona con una ausencia de la proteína GFP viral. Esta falta de fluorescencia no interfirió con el desarrollo normal de la infección por Baculovirus: las células se lisaron al cabo de cuatro días de haberse tomado las muestras. Otro parámetro que indica que la infección de Baculovirus no fue afectada por la transfección es el corrimiento de la desviación lateral de luz (SS).



**Figura 5.- Citometría de Flujo** de células SF21 infectadas a MOI 0.05 de AcMNPV-GFP previa transfección con dsRNA homólogo a gfp, gp64 o al promotor de polihiedrina como control negativo. En el panel superior se muestra la cuantificación de la cantidad de células expresando GFP: el recuadro gris muestra la ventana GFP positiva y el porcentaje la cantidad de células dentro de esta ventana. En el panel inferior: relación entre la “dispersión frontal de luz” (FS) y la “dispersión lateral de luz” (SS) de las mismas células infectadas. Como puede verse sólo hay un corrimiento de la



La cuantificación de GFP en las células transfectadas con dsRNA-gp64 también resultó considerablemente disminuida. En este caso la desviación lateral de luz (SS) no se ve alterada lo que indica que la disminución en la cantidad de células expresando GFP se debe a una disminución en el número de células infectadas con AcMNPV-GFP.

En el caso de las células transfectadas con dsRNA-gp64 no se está inhibiendo la infección viral sino que se están produciendo virus mutantes (GP64 negativos) no infectivos. Estos virus mutantes provienen de las células infectadas con la administración primaria del virus original de AcMNPV-GFP a MOI 0.05 (una de cada 20 células). La presencia de la glicoproteína viral GP64 en la cápside viral es sólo necesaria para que el virus entre a una célula pero no para el progreso de la infección viral una vez iniciada.

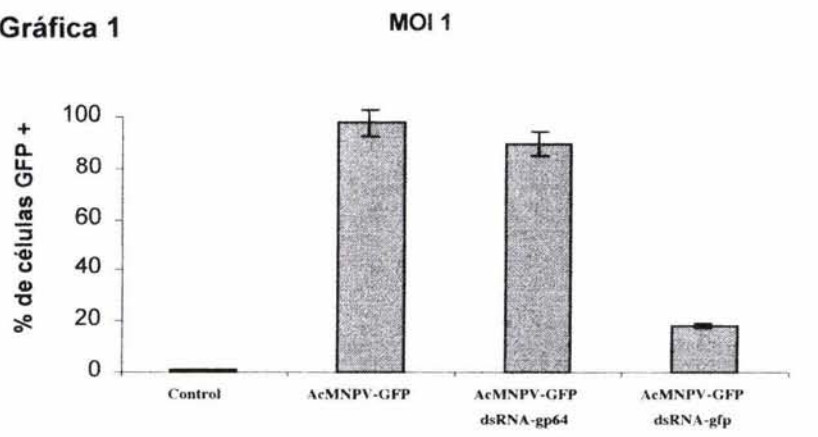
Estos experimentos demuestran que la inhibición de genes virales con dsRNA es posible y además específica.

Por otro lado la transfección de dsRNA homólogo al promotor viral de Polihedrina (dsRNA-PhP) que controla la expresión de GFP en los Baculovirus recombinantes AcMNPV-GFP, no tuvo ningún efecto en el transcurso de la infección viral o la expresión de GFP. Este resultado indica que el tipo de inhibición que se observa es de tipo postranscripcional.

En los experimentos en que se infectaron células Sf21 a una MOI de 1, (un virus por célula) la transfección con dsRNA-gp64 no tuvo ningún efecto. Esto porque al utilizar una MOI de 1 todas las células fueron infectadas por la administración inicial de AcMNPV-GFP. Aunque los virus producidos por estas células posiblemente eran GP64 negativos, las células murieron y expresaron GFP por la infección primaria. Resultados de este experimento se muestra en la gráfica 1.

Utilizando una MOI de 1, la inhibición de dsRNA-gfp es de aproximadamente 80% comparado a un 94% a MOI de 0.05. Esta disminución en el efecto de inhibición del dsRNA es seguramente debido a la sobresaturación del sistema de RNAi para inhibir la traducción del RNA mensajero de GFP.

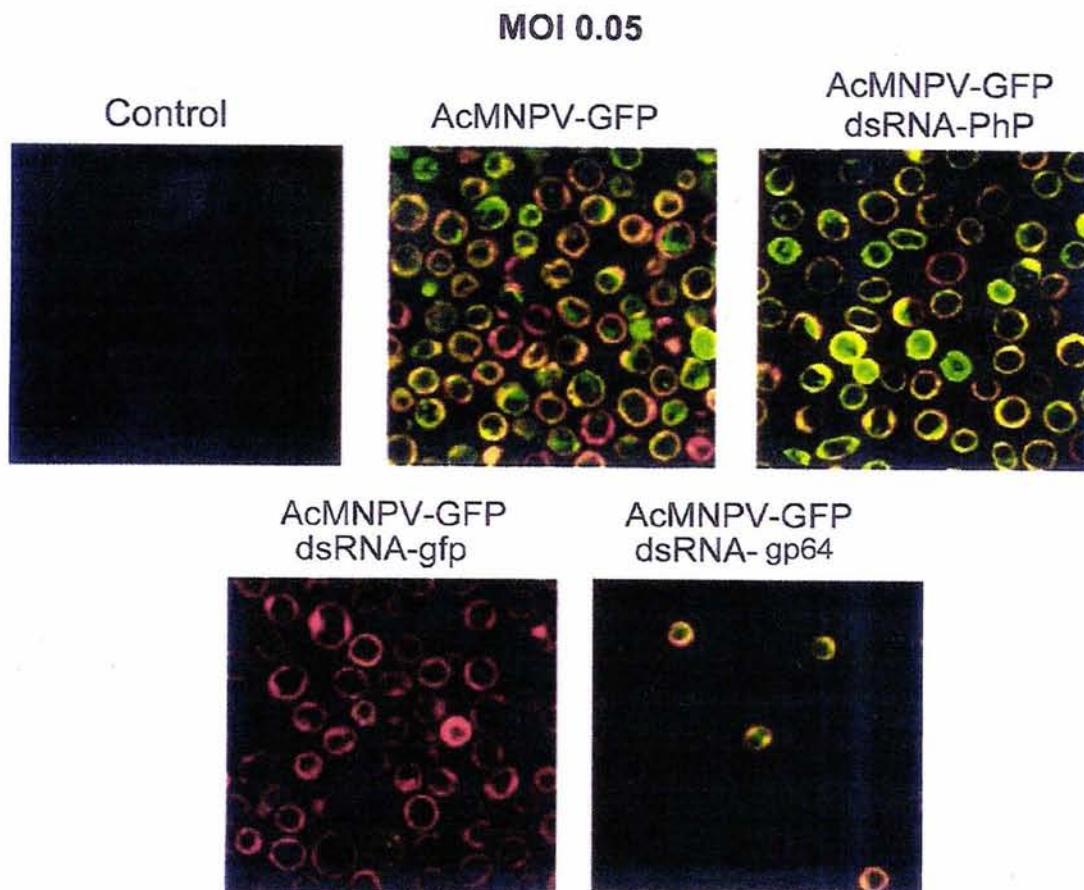
Gráfica 1



Cuantificación de la cantidad de células expresando GFP por citometría de Flujo. Las células fueron infectadas a MOI de 1 de AcMNPV-GFP. La cantidad de células GFP+ es muy parecida entre las células transfectadas con dsRNA-gp64 y las que no fueron transfectadas. El dsRNA homólogo a GFP inhibió en más de un 80% la fluorescencia de GFP en las células infectadas.

En el momento que Baculovirus infecta una célula, algunas de las proteínas de la cápside viral son dirigidas a la membrana celular, entre ellas GP64. Cuando los viriones producidos al interior de las células salen a través de la membrana celular éstos toman consigo parte de la membrana y con ella proteínas virales<sup>33</sup>. Por esto, la glicoproteína viral GP64 puede ser detectada en la membrana celular de las células infectadas con Baculovirus. Así pues, en las células infectadas con AcMNPV-GFP, la presencia de GFP en el citosol y GP64 en la membrana plasmática sin indicativos de la infección viral.

Para detectar la presencia de GP64 en las células infectadas se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para GP64. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo acoplado a Rodamina. En la figura 6 se muestran imágenes de microscopía confocal de células transfectadas con dsRNA-gfp, dsRNA-gp64 y dsRNA homólogo al promotor viral polihedrina. (dsRNA-PhP). 48 horas después de la transfección todas las células fueron infectadas a MOI de 0.05 de AcMNPV-GFP.



**Figura6.- Microscopía confocal** de células Sf21 96 horas post infección con AcMNPV-GFP (MOI 0.05) La fluorescencia de la proteína GFP se ve en el canal Verde. La señal de GP64 en el canal Rojo. En amarillo se observa la colocalización de ambos canales.



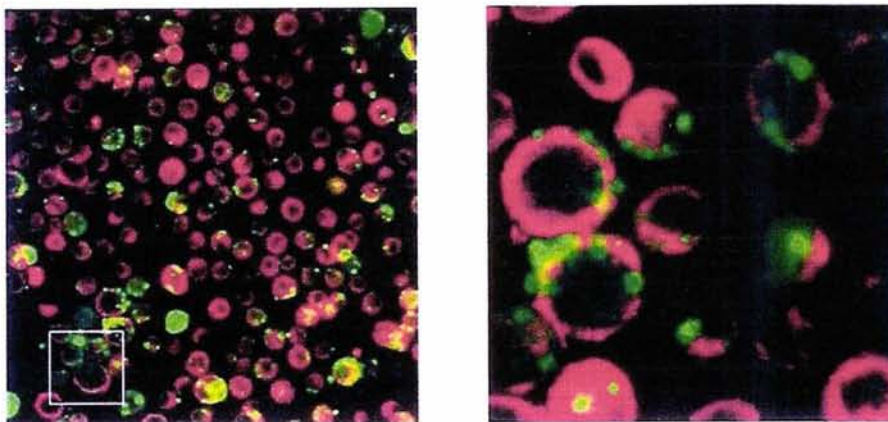
Como puede verse, las células que no fueron transfectadas con dsRNA o que fueron transfectadas con dsRNA-PhP expresan GFP y presentan una señal positiva para GP64 resultado de la infección viral con AcMNPV-GFP. Por otro lado, las células que fueron transfectadas con dsRNA-gfp no expresan la proteína fluorescente verde pero si presentan señal de fluorescencia en el canal rojo que corresponde a GP64. Este resultado indica que el efecto del dsRNA-gfp fue específico para interferir con la traducción de GFP pero no interfirió con la infección viral.

Por el contrario, la mayoría de las células transfectadas con dsRNA-gp64 no presentan síntomas de infección viral (no expresan GFP y dan señal negativa para GP64). En la imagen *dsRNA-gp64* se ven algunas células GFP+, GP64+. Éstas seguramente corresponden a las células que fueron infectadas por la administración inicial del virus –MOI 0.05 (una de cada veinte células) o que no fueron transfectadas eficientemente.

### **El dsRNA se localiza en el interior del citoplasma celular.**

Para confirmar que el dsRNA estaba entrando al interior de las células se realizaron transfecciones de células Sf21 con dsRNA marcado con fluoresceína (verde). El tamaño de estos dsRNA es de 21 nucleótidos, igual a los siRNAs mediadores del fenómeno de RNAi. Para tener una referencia del citoplasma, las células transfectadas con los siRNA fluorescentes fueron incubadas con el compuesto permeable *Brefeldina A* acoplada a BODIYP™ 558/568; un compuesto fluorescente rojo. La *Brefeldina* resulta un excelente marcador de retículo endoplasmático y aparato de Golgi, lo que da una clara referencia del citoplasma celular.

En la figura 7 se muestra una imagen de microscopia confocal donde se observa que el dsRNA fluorescente está en el interior de las células. También puede observarse que su localización es exclusivamente citoplasmática. El núcleo celular aparece como una zona circular oscura en el centro de la célula. La imagen de la derecha es un acercamiento a la imagen de la izquierda.

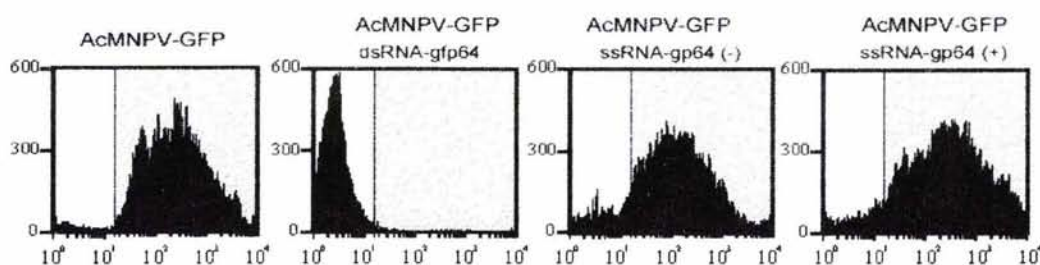


**Figura7.- Microscopia Confocal** de células Sf21 transfectadas con dsRNA fluorescente. En verde se ve el siRNA acoplado a fluoresceína. En el canal Rojo se muestra la señal de Brefeldina-BODIYP que marca citoplasma celular. Al centro, el núcleo celular aparece como una zona oscura. A la derecha se muestra un acercamiento del recuadro blanco de la imagen de la izquierda.

## El efecto observado es debido al dsRNA y no al ssRNA.

El efecto de RNA de interferencia es producido por el RNA de hebra doble (dsRNA). Sin embargo desde hace más de dos décadas hay grupos que han intentado usar RNA antisentido y complementario al mRNA para inhibir su traducción. A este sistema se le conoce como “RNA antisentido” y no involucra el sistema de RNAi ni la degradación del mRNA. Los resultados obtenidos basados en esta metodología han sido muy variables.

Para verificar que el efecto que nosotros observamos es debido al RNA de hebra doble y no al RNA de cadena sencilla se transfectaron células Sf21 con dsRNA-gp64, ssRNA-gp64 sentido al mRNA (+), y ssRNA-gp64 secuencia antisentido (-) al mRNA. Las células así tratadas fueron después infectadas a una MOI de 0.05 y analizadas por citometría de flujo 96 horas post-infección.



**Figura 8.- Citometría de Flujo** de células Sf21 transfectadas y luego infectadas con AcMNPV-GFP (MOI 0.5). El recuadro gris muestra la zona GFP+. ssRNA-gp64 (-) es RNA de hebra sencilla complementaria y anti sentido al mRNA de gp64. ssRNA-gp64 (+) es RNA de hebra sencilla de secuencia homóloga al mensajero de GP64. dsRNA es RNA de hebra doble.

Como puede observarse en la figura 8, ni el ssRNA-gp64 sentido (+) ni antisentido (-) tuvieron un efecto considerable en la inhibición de la fluorescencia comparado con el efecto obtenido con el dsRNA.

Este resultado era esperado pues en la literatura se ha demostrado que la inhibición con RNA antisentido en la mayoría de los casos es pobre o difícil de lograr<sup>147-149</sup>. Esto debido en parte a la inestabilidad de las moléculas de ssRNA. Por su parte, el dsRNA ha mostrado una estabilidad sorprendente y una resistencia a la degradación por RNasas.

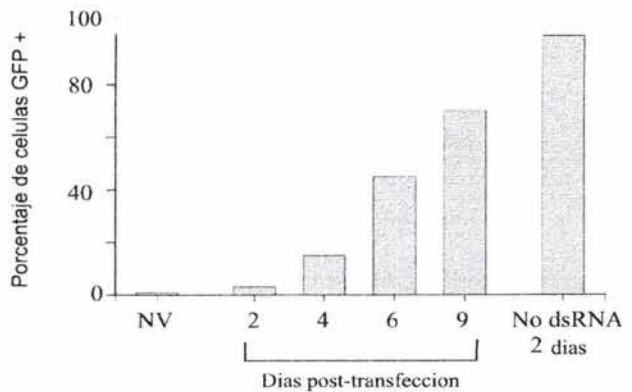
## El dsRNA-gfp tiene un efecto prolongado para inhibir la traducción del mensajero de GFP.

Para determinar por cuanto tiempo era eficiente el dsRNA para iniciar el RNAi una vez en el citoplasma, células Sf21 fueron transfectadas con dsRNA homólogo a GFP. Estas células fueron infectadas a una MOI de 0.5 distintos días post-transfección. El efecto del RNAi fue cuantificado midiendo, con citometría de flujo, la cantidad de células expresando GFP.



Como puede verse en la gráfica 2, cuando las células fueron infectadas después de 9 días de haber sido transfectadas con el dsRNA, hay un considerable aumento en el número de células que expresan GFP (78%) en comparación de las que fueron infectadas 48 horas post-transfección (10%). Sin embargo, aun se observa el efecto del dsRNA para inhibir la expresión de un gen viral. La sorprendente duración del efecto del dsRNA para iniciar el RNAi es explicable si tomamos en cuenta la estabilidad del dsRNA al interior de las células. Cuando éste entra y es digerido por Dicer en fragmentos de 21 nucleótidos (siRNAs) se ha reportado que tiene una estabilidad sobresaliente y resistencia a degradación por otras RNAsas<sup>76</sup>.

**Gráfica 2**

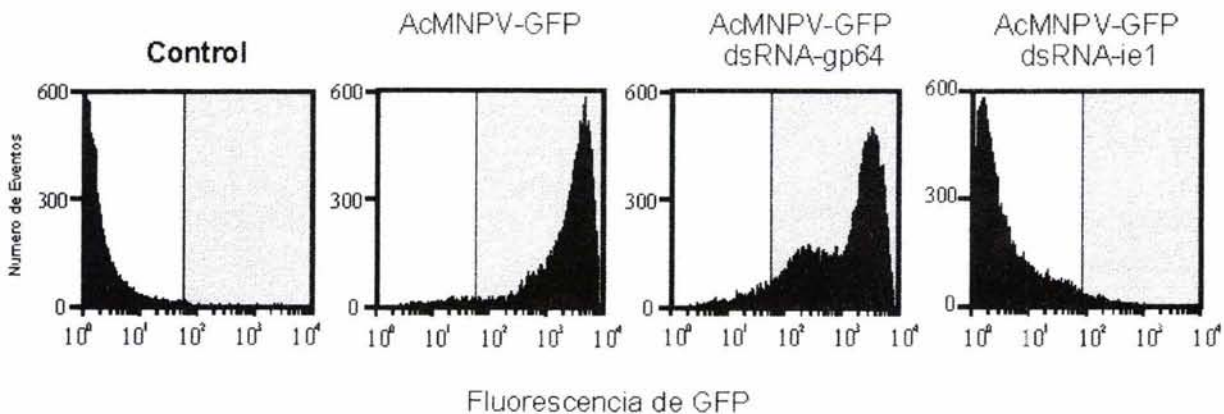


Porcentaje de células Sf21 expresando GFP cuantificado por citometría de flujo. Las células fueron infectadas a un MOI de 0.5 distintos días después de haber sido transfectadas con dsRNA-gfp. Todas las muestras corresponden a 72 horas post infección. El 94 % de las células que no fueron transfectadas con dsRNA eran positivas para GFP a los 2 días mientras que las que fueron tratadas con dsRNA-gfp apenas presentaban fluorescencia en el canal verde (8%). NV= no virus: control de células sin infectar.

### La transfección de células de insecto con dsRNA homólogo al gen viral *ie1* inhibe el progreso de la infección viral.

Para probar que es posible inhibir una infección viral utilizando RNA de interferencia, células Sf21 fueron transfectadas con dsRNA homólogo al factor temprano de transcripción viral IE1. Este factor de transcripción temprano es esencial para el progreso de la infección viral<sup>32,150,151</sup>. Mutantes que carecen de IE1 no son infectivos y los virus no pueden duplicarse. Este resultado hablaba de la importancia de este factor de transcripción como una proteína clave para llevar a cabo los procesos que significan la infección viral de Baculovirus.

MOI = 1



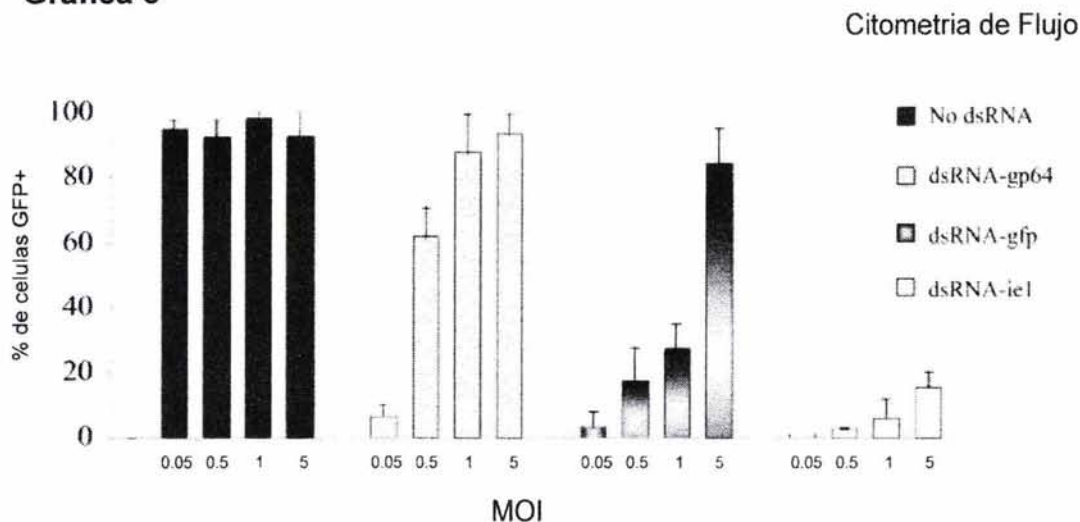
**Figura9.- Citometría de Flujo.** El recuadro gris muestra la zona GFP +. Las células Sf21 fueron transfectadas con dsRNA homólogo a gp64 o a *ie1* antes de ser infectadas con AcMNPV-GFP (MOI 1). Las muestras fueron analizadas 72 horas post-infección.

Como puede verse en la figura 9, la transfección con dsRNA-ie1 disminuyó considerablemente el porcentaje de células verdes a niveles comparables a los obtenidos en las células sin infectar (control). Como era de esperarse la previa transfección de las células con dsRNA-gp64 tubo un efecto casi nulo en la fluorecscencia dado que se está manejando MOI igual a 1.

Para explorar el alcance de la inhibición de genes virales con RNAi se realizaron experimentos a distintas multiplicidades de infección (MOI de 0, 0.05, 0.5, 1 y 5) de AcMNPV-GFP.

Como puede verse en la gráfica 3, la transfección con dsRNA-ie1 previa a la infección con AcMNPV-GFP fue efectiva para detener la infección viral. Incluso a MOI de 5 –lo que representa que por lo menos cada célula fue infectada por cinco partículas virales –hay una reducción de 85% en el número de células expresando GFP respecto al control de células sin transfectar e infectadas a la misma MOI.

**Grafica 3**



Cuantificación del porcentaje de células expresando GFP por citometría de flujo: 48 horas antes de infectar las células con AcMNPV-GFP, éstas fueron transfectadas con dsRNA homólogo a gp64, gfp o ie1. Al cabo de 72 horas post-infección se evaluó el porcentaje de células expresando GFP.

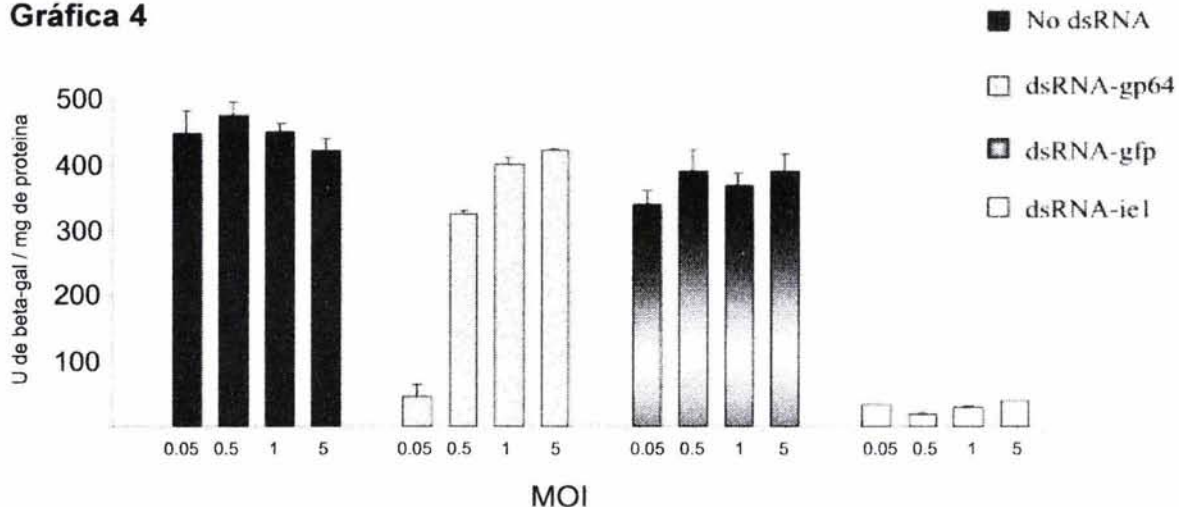
En el caso de las células transfectadas con dsRNA-gp64, sólo hay una reducción del porcentaje de células verdes cuando se utiliza baja MOI. Esto, como se mencionaba anteriormente, es debido a que en el caso de interferir a GP64, se depende de una disminución en la infectividad de los virus al ocurrir la re-infección. Al utilizar una MOI de 1, todas las células son infectadas por una partícula viral, lo que es suficiente para que todas expresen GFP al cabo de 72 horas.

Los resultados obtenidos al transfectar las células con dsRNA-gfp también nos hablan de los alcances del RNAi para inhibir un gen viral. La inhibición de GFP es muy eficiente a MOI de 0.05 y 0.5. Sin embargo a MOI 5 el sistema de RNAi es saturado por la enorme carga viral, expresándose GFP a niveles comparables a las de las células no transfectadas.



Para tener una mejor idea acerca de la eficiencia del RNAi para inhibir el progreso de la infección viral se cuantificó la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa presente en las células infectadas con Baculovirus (gráfica 4). El gen LacZ es un segundo gen reportero viral presente en los Baculovirus recombinantes AcMNPV-GFP.

**Gráfica 4**



Cuantificación de la enzima  $\beta$ -galactosidasa expresada por las células infectadas con AcMNPV-GFP. Como en los casos anteriores las células fueron transfectadas con 5  $\mu$ g de dsRNA por cada millón de células Sf21 48 horas antes de ser infectadas. Los datos mostrados fueron obtenidos de extractos celulares colectados 72 horas de transcurrida la infección.

Como era de esperarse, la transfección con dsRNA-gfp no tuvo ningún efecto en la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa presente en los extractos celulares. Esto porque la expresión de GFP es dispensable para el progreso de la infección viral.

Por el otro lado la transfección de las células con dsRNA homólogo a ie1, si tiene un marcado efecto en la producción de  $\beta$ -galactosidasa. Este era un resultado esperado puesto que IE1 es indispensable para la infección viral. El efecto inhibitorio del dsRNA-ie1 es observado incluso a altas dosis virales como es MOI de 5.

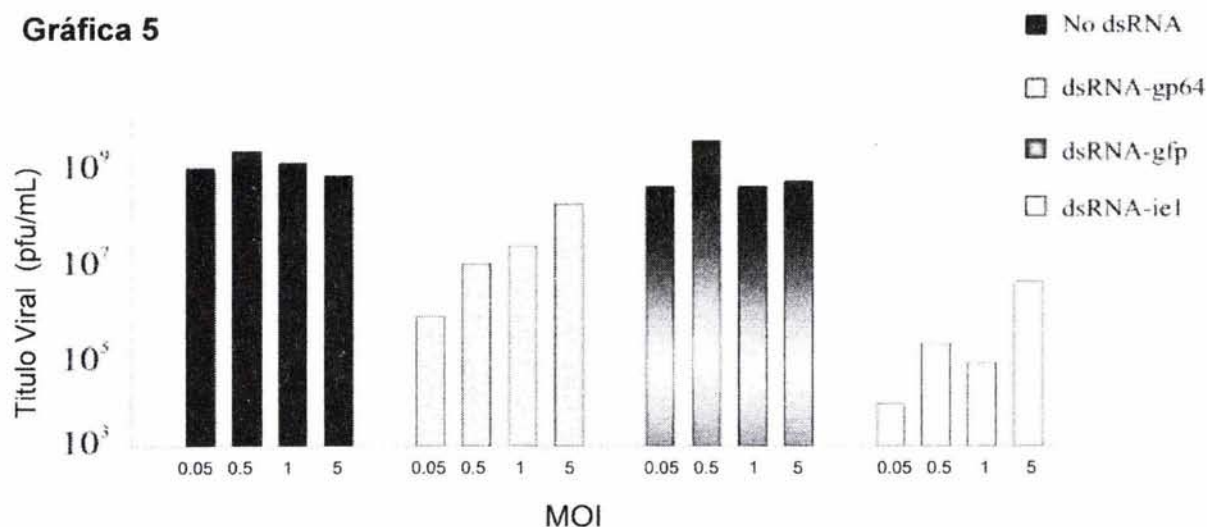
Por su parte el tratamiento con dsRNA-gp64 tuvo éxito a baja MOI pero no a MOI de 5, observándose un comportamiento similar a los experimentos anteriores donde se utilizó a GFP como reportero de la infección viral.

Cuando Baculovirus infecta las células de insecto éstas mueren al cabo de un periodo de entre 6 y 7 días. Los sobrenadantes de estas células presentan una alta concentración de partículas virales infectivas. El título viral (pfu/ml) de estos sobrenadantes tiene una relación directa con el grado de infección.

Para determinar el título viral de los sobrenadantes de las células tratadas con los distintos dsRNA (gp64, gfp e ie1) se tomó sobrenadante a las 72 horas post-infección y se prosigió a realizar los ensayos de placa para conocer el título viral de éstos.

En la siguiente gráfica se presentan las cuantificaciones del título viral de los sobrenadantes:

**Gráfica 5**



Cuantificación del título viral (pfu/ml) de los sobrenadantes de las células Sf21 transfectadas con los distintos dsRNA y luego infectadas a distintas MOI de AcMNPV-GFP. Todas las muestras de sobrenadante fueron tomadas 72 horas post infección. Para cuantificar el título viral se utilizó el ensayo de placa en busca de la aparición de placas GFP positivas.

Como era de esperarse el tratamiento con dsRNA-gfp no tuvo efecto alguno en el título viral de los sobrenadantes de las células tranfectadas.

Por su parte los sobrenadantes de las células transfectadas con dsRNA-ie1 mostraron un importante decremento en el título viral. Incluso a altas MOI donde la disminución fue de alrededor de tres ordenes de magnitud en las pfu/ml. Esta disminución es posiblemente causada por la disminución en el número de células infectadas dado el efecto del RNAi para detener el progreso de la infección viral. Es probable que los virus detectados en este ensayo fueran provenientes de las células que no fueron transfectadas con dsRNA-ie1.

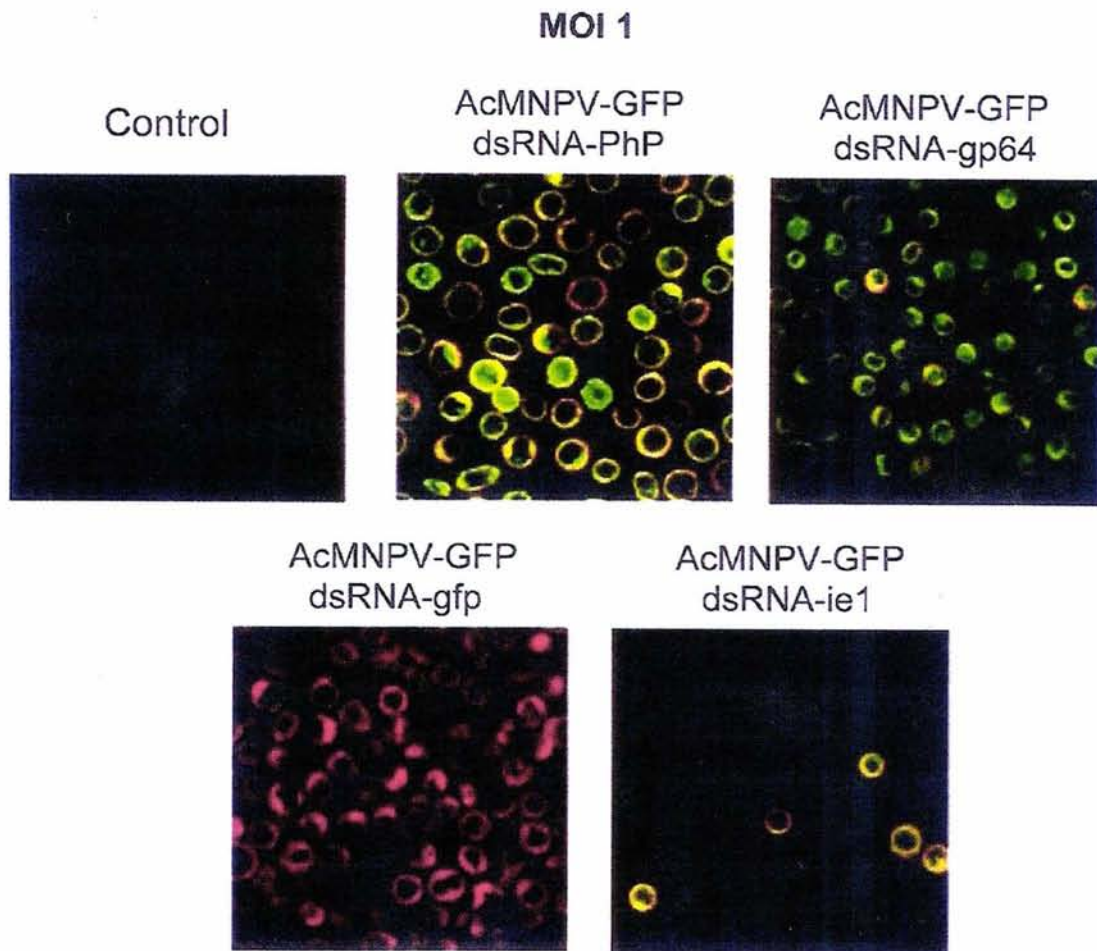
En el caso de las células transfectadas con dsRNA-gp64 también hay una marcada disminución en el título viral. Por ejemplo, en el caso de las células infectadas a MOI 0.05, 0.5 y 1 el decremento es superior a los dos órdenes de magnitud en el título viral. Este decremento en el número de partículas virales es debido no tanto a una inhibición de la infección sino más bien a que las partículas virales eran menos o nada infectivas por la ausencia de GP64 en la cápside viral. Los virus detectados en este ensayo tal vez provengan de las células que no fueron transfectadas con dsRNA-gp64.

Cuando las células infectadas a MOI 1 de AcMNPV-GFP fueron analizadas por medio de microscopía confocal después de la transfección con los diferentes dsRNAs, se observa que dsRNA-gp64 fue capaz de inhibir la producción de GP64 en la membrana de las células. (Figura 10). Estas células aunque se lisaron al cabo de varios días (debido a que todas las células recibieron una carga viral de uno - MOI 1) no expresaron GP64 en su superficie. El indicativo de que todas las células estaban infectadas es la presencia de GFP al interior de



las mismas. Esta es una evidencia más que nos indica que los virus producidos de estas células eran GP64 negativos.

Como se esperaba, la transfección de dsRNA-PhP no tuvo ningún efecto, y la transfección con dsRNA-gfp inhibió la producción de proteína GFP pero no de la infección, hecho que explica la presencia de GP64 en la superficie celular. Por su parte el efecto de RNAi inducido con dsRNA-ie1 previno la infección viral como se demuestra por la casi ausencia de la señal de GFP y GP64. Las células positivas a GFP y GP64 corresponden, posiblemente, a las que no fueron transfectadas con dsRNA.



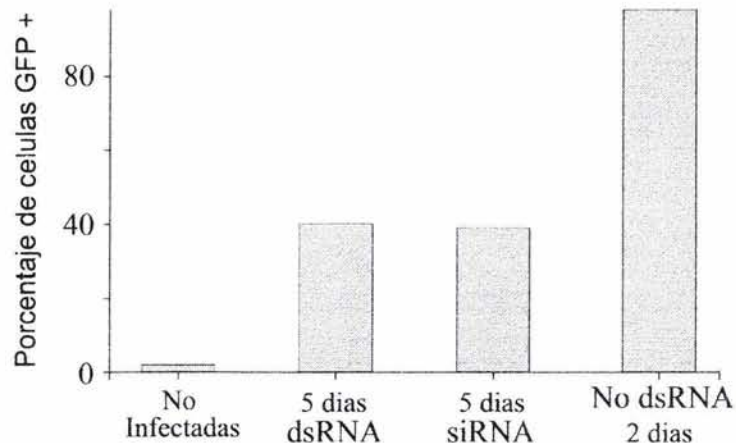
**Figura 10.- Microscopía confocal.** Células Sf21 infectadas a una MOI de 1 de AcMNPV-GFP posterior a la transfección con los distintos dsRNA. La fluorescencia de la proteína GFP se muestra en el canal Verde. La señal de GP64 en el canal Rojo. En amarillo se observa el montaje de ambos canales. Todos los campos mostrados tienen la misma amplificación.

## Los siRNAs tienen el mismo efecto para inhibir genes virales que el dsRNA.

En el RNAi son los fragmentos de 21 nucleótidos de dsRNA los verdaderos efectores del fenómeno de interferencia. Al no haber trabajo experimental previo en células de insecto que sugiriera que también son los siRNAs los responsables del fenómeno nos dimos a la tarea de probarlo.

Para esto se digirió 1  $\mu\text{g}$  de dsRNA-gfp con la enzima recombinante Dicer humana. Los siRNA así obtenidos fueron transfectados en células de insecto. Al mismo tiempo se transfectaron células Sf21 con la misma cantidad de dsRNA-gfp (700 nucleótidos) como control positivo. Al cabo de 48 horas post-transfección las células fueron infectadas a una MOI de 0.5 con AcMNPV-GFP. El porcentaje de células expresando GFP (GFP+) se evaluó a los 5 días post-infección mediante citometría de flujo.

Gráfica 6



Como puede verse el efecto inhibitor del dsRNA comparado con el siRNA (gráfica 6) es el mismo. A los 5 días de infección ambas muestras (siRNA y dsRNA) mostraban un poco menos del 40% de células GFP+. Por su parte en las muestras que no fueron transfectadas con dsRNA había más de un 90% de células verdes a los 2 días post-infección.

Para evaluar de manera directa la ausencia de la proteína mediada por el RNAi se realizaron ensayos Western blot para detectar la presencia o ausencia de proteína. Para detectar a GP64, en extractos celulares de células Sf21 infectadas con AcMNPV-GFP, se empleó el mismo anticuerpo monoclonal (AcV5) usado para los ensayos de microscopia confocal. Este anticuerpo detecta a GP64 en la forma glicosilada y no glicosilada. Para detectar GFP se utilizó el anticuerpo comercial *anti-express* que reconoce un epítipo específico en la proteína fluorescente.

Como puede verse en la figura 11, los anticuerpos anti -GP64 o -GFP no detectan la presencia de estas proteínas en las células que no han sido infectadas (MOI 0) con el

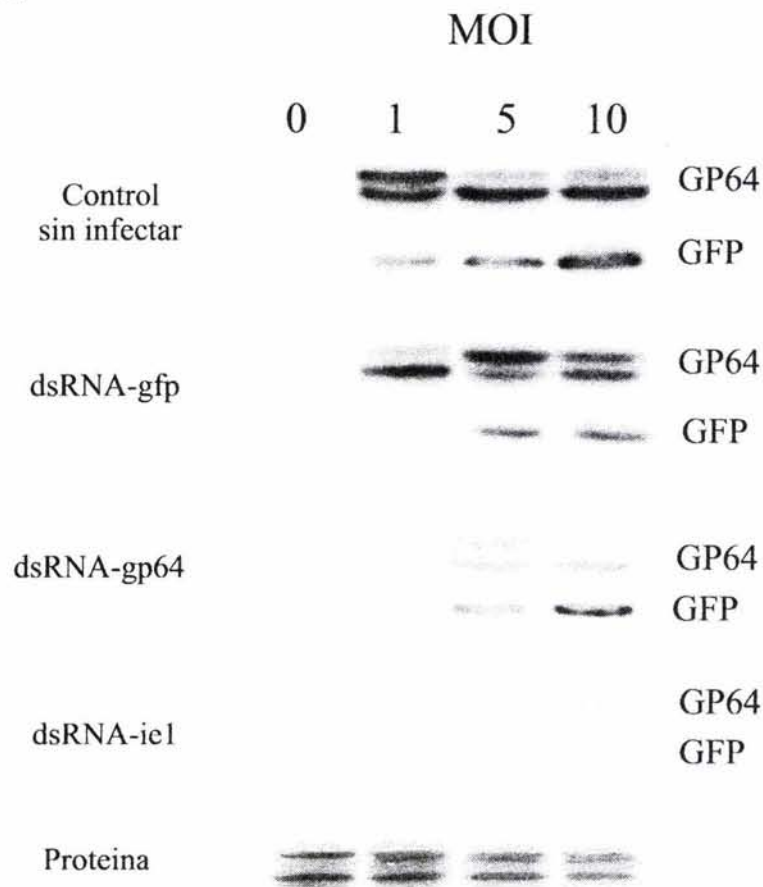


Baculovirus. En células infectadas (MOI 1, 5 o 10) el anticuerpo anti-GP64 reconoce las dos formas de GP64. La presencia de esta proteína viral correlaciona con la presencia de GFP.

Cuando las células fueron transfectadas 48 horas antes de la infección con dsRNA-GFP, el patrón de expresión de GP64 no se ve alterado, pero si disminuye considerablemente la cantidad de GFP presente en las muestras correspondientes a MOI 1. A mayores MOI, el efecto inhibitorio de dsRNA-gfp es rebasado por la maquinaria viral como lo demuestra la presencia de GFP.

Un efecto similar se observa en las células transfectadas con dsRNA-gp64; a MOI 1 no se detecta la proteína GP64 ni GFP. Sin embargo a mayores MOI el efecto inhibitorio de dsRNA-gp64 se pierde.

Cuando se utiliza dsRNA-ie1, la disminución de GP64, y por consiguiente GFP, es muy marcada, incluso a altas MOI. De hecho la presencia de GFP no es detectada ni siquiera a MOI 10.



**Figura 11.- Western Blot** de extractos celulares de células Sf21 infectadas a distintas MOI de AcMNPV-GFP previa transfección con los distintos dsRNAs. En todos los carriles se cargó la misma cantidad de proteína celular (10 µg). En el panel inferior se muestra un fragmento de cada gel teñido con *rojo ponceau* como control de cargado. En los carriles correspondientes a GP64 se observan dos bandas debido a que el anticuerpo utilizado detecta tanto la forma glicosilada como la que no lo esta.

En el Western Blot es claro que hay una disminución en la cantidad de proteína, sin embargo, hay ocasiones en las que la ausencia de proteína no se correlaciona con una disminución en la cantidad de RNA mensajero. En el RNAi el dsRNA degrada al RNA mensajero homólogo y aunque nosotros ya habíamos probado que era el dsRNA el responsable del efecto inhibitorio, decidimos comprobar que el efecto inhibitorio se debía a una disminución en la cantidad de mRNA.

Para esto se realizaron ensayos RT-PCR semicuantitativo a partir de RNA total de células transfectadas y luego infectadas. Para esto se usaron oligos específicos para cada uno de los genes. (ver métodos) Como control de cargado se utilizó al gen de actina de *Spodoptera frugiperda*. Como puede verse en la figura 12, en las células no infectadas sólo se detectó la presencia del mensajero de Actina. Cuando las células fueron infectadas con AcMNPV-GFP se detectan mensajeros de gfp, gp64 e ie1. Aunado a la aparición de mensajeros virales se observa la disminución del mRNA de actina. Esto debido probablemente, a que al progresar la infección viral, la maquinaria celular se dedica exclusivamente a la producción de mensajeros virales lo que deja de lado la producción de proteínas celulares esenciales como Actina<sup>26,49</sup>.

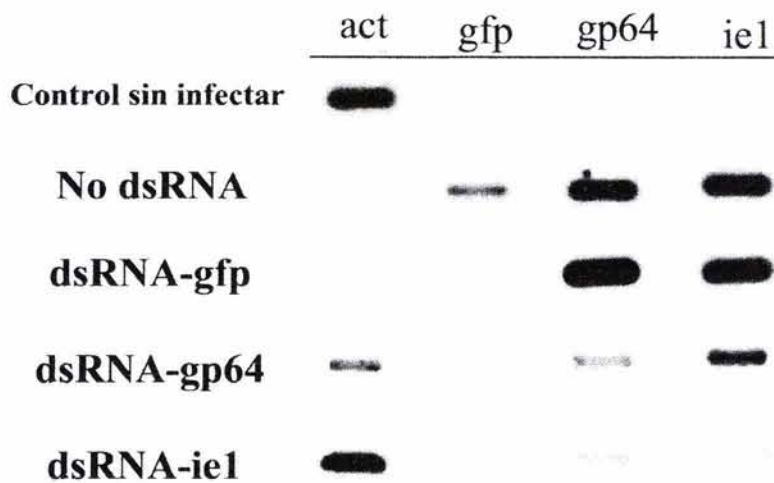


Figura 12.- RT-PCR a partir de RNA total aislado de células Sf21 infectadas a una MOI 1 de AcMNPV-GFP previa transfección con los distintos dsRNA. act = actina de *S frugiperda*,

Cuando las células fueron transfectadas con dsRNA-gfp previo a la infección, no se detecto mensajero de GFP pero si de GP64 e IE1. Por su parte actina se encontró disminuida como en el control de células sin transfectar lo que corrobora que estas células están llevando acabo todos los procesos de la infección por AcMNPV-GFP y que por lo tanto dsRNA-gfp no interfiere con la expresión de los genes virales.

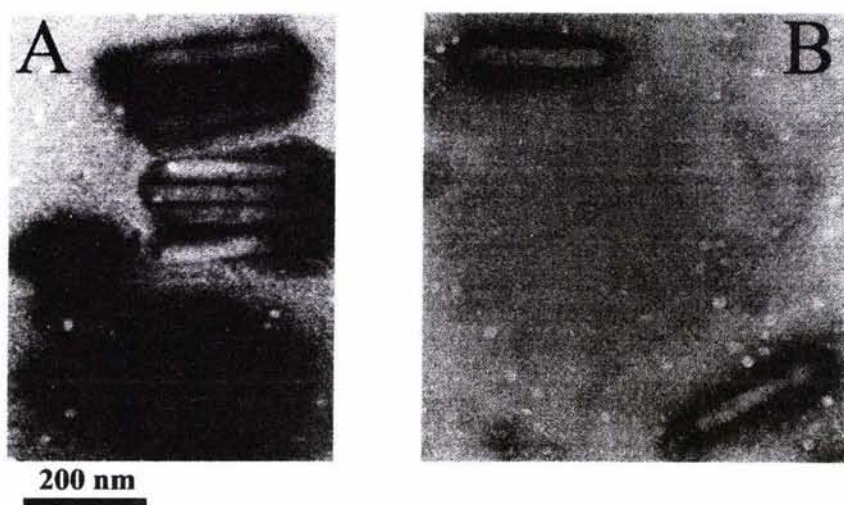
El dsRNA homólogo a gp64 fue capaz de inhibir el mensajero de GP64. Junto con esto hay una considerable disminución del mRNA de ie1 además de que el mensajero de GFP no es detectado. Interesantemente también se recupera en parte la expresión de actina como lo demuestra el aumento en la cantidad de mensajero. Esto sin duda se debe a la inhibición de la infección viral.



Cuando las células son transfectadas con dsRNA-*ie1*, y como se ha demostrado en los experimentos anteriores, hay una clara inhibición del progreso de la infección viral. Esto puede ser corroborado en este RT-PCR: el mensajero de *ie1* decae de manera importante. La ausencia de IE1 detiene el progreso de la infección viral lo que resulta en la ausencia del mensajero de GP46 y GFP. Por su parte los niveles del mensajero de actina se reestablecen a niveles basales; resultado de la inhibición de la infección viral.

En los experimentos previos se ha demostrado que la transfección con dsRNA-gp64 resulta en una inhibición de la re-infección más que en la infección. Esto tal vez se debe a que las células transfectadas están produciendo virus carentes de GP64 que no son capaces de reinfectar células. Esto se apoya en el hecho de que las células no expresan GP64 pero si GFP, y a que el título viral de los sobrenadantes se ve considerablemente disminuido.

Por medio de microscopía electrónica se buscó la presencia de virus GP64 negativos en los sobrenadantes de células transfectadas con dsRNA-gp64. Sin embargo, las partículas virales fueron extremadamente difíciles de encontrar. Nosotros hubiéramos esperado un número parecido de virus mutantes dado que todas las células presentaban signos de infección. En la figura 13 se muestra de lado izquierdo (Fig. 13A) virus encontrados en sobrenadantes de células transfectadas con un dsRNA no relacionado. De lado derecho (Fig. 13B) se muestran unos de los pocos virus que fuimos capaces de encontrar en los sobrenadantes de células transfectadas con dsRNA-gp64 y luego infectadas con AcMNPV-GFP. Nosotros no fuimos capaces de encontrar alguna diferencia en la cápside de estos virus. Esto nos lleva a pensar que las células transfectadas con dsRNA-gp64 no solo están produciendo virus carentes de la glicoproteína de la cápside viral GP64, sino que estas partículas virales no están logrando salir de las células. Con base en esto, concluimos que la disminución en el título viral de las células dsRNA-gp64 se debe más a la ausencia de virus que a la presencia de virus mutantes.



**Figura 13.- Microscopía Electrónica.** A) Baculovirus AcMNPV-GFP aislados de los sobrenadantes de células transfectadas con un dsRNA no relacionado. B) virus encontrados en el sobrenadante de células transfectadas con dsRNA-gp64 previa infección con AcMNPV-GP64. Además de la disminución en el número de partículas virales observadas en los sobrenadantes de las células tratadas con dsRNA-gp64, por medio de microscopía electrónica no fuimos capaces de ver alguna otra diferencia en los virus producidos por estas células.

Poco se sabe acerca de los procesos que ocurren en el momento que un Baculovirus abandona la célula y hasta la fecha GP64 sólo había sido relacionada con la entrada. Sin embargo harán falta más experimentos para demostrar que verdaderamente es GP64 esencial en la salida de los Baculovirus de una célula infectada.

### **El dsRNA es capaz de inhibir la infección viral de Baculovirus *in vivo*.**

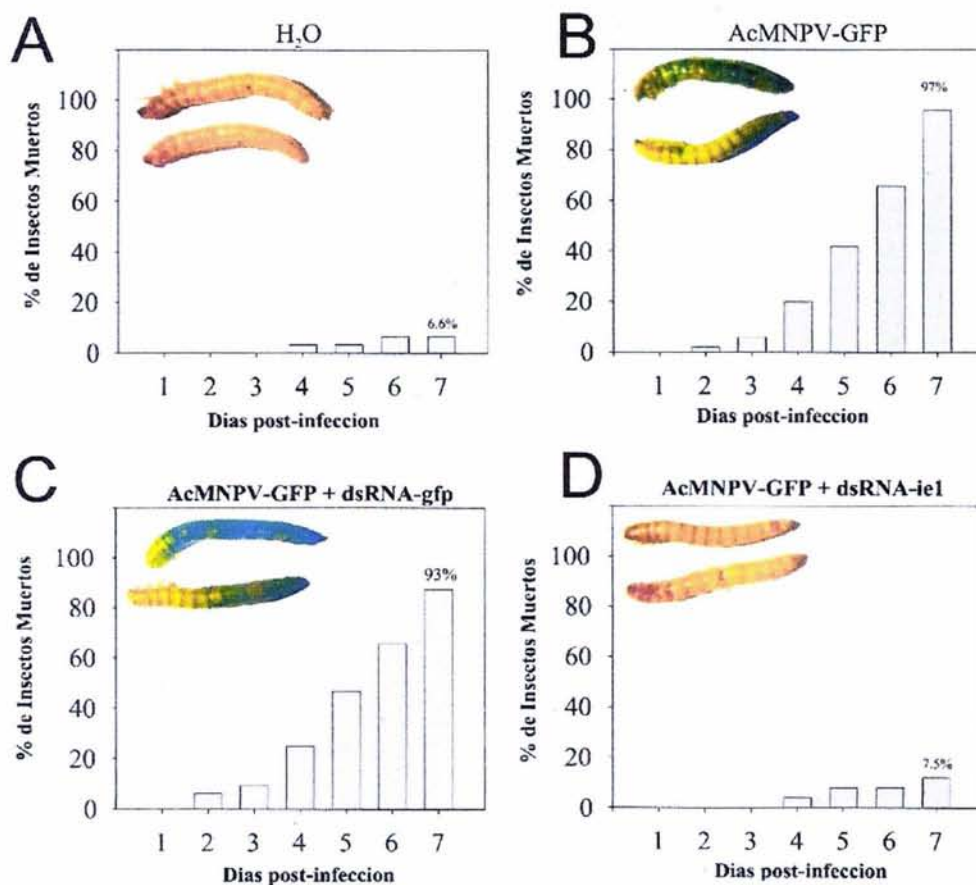
Los experimentos anteriores demostraron que el dsRNA es capaz de interferir con la traducción de genes virales estructurales y no estructurales de Baculovirus en una línea celular. La interferencia del gen *ie1* con dsRNA homólogo a éste resulta en una importante inhibición del proceso de infección. Ahora pues, nos decidimos a probar si el dsRNA era capaz de interferir con la expresión de genes virales *in vivo*. Para esto inyectamos dsRNA homólogo a *ie1* o *gfp* en la hemolinfa de larvas del escarabajo *Tenebrio molitor* 24 horas previo a una inyección de una dosis letal de Baculovirus.

La inyección de 2  $\mu$ l del stock de AcMNPV-GFP con un título viral de  $1 \times 10^7$  pfu/ml provoca la muerte del 97% de las larvas inyectadas al cabo de 7 días. (Fig. 14B). Además, las larvas expresan  $\beta$ -galactosidasa; el segundo gen reportero presente en los Baculovirus recombinantes

La inyección de 0.5  $\mu$ g de dsRNA-*gfp* en la hemolinfa del insecto previa a la administración de la dosis letal de Baculovirus no tuvo ningún efecto en la supervivencia de las larvas (7% de supervivencia al cabo de 7 días) o en la expresión  $\beta$ -galactosidasa. (Figura 14C).

Cuando a las larvas se les administro la misma cantidad de dsRNA homólogo a *ie1* previo a la infección con Baculovirus, el porcentaje de insectos muertos al cabo de siete días disminuyó dramáticamente. Sólo el 7 % de los insectos habían muerto, comparado al 93% de las larvas inyectadas con dsRNA-*gfp*. Otro indicativo de que la infección viral se detuvo es la ausencia de  $\beta$ -galactosidasa en las larvas (Fig. 14C).



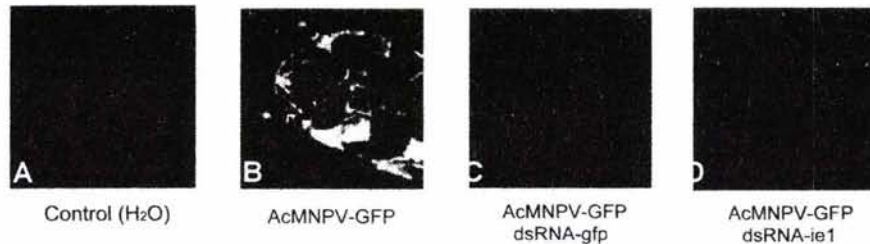


**Figura 14.- Inhibición de la infección viral de Baculovirus *in vivo*.** Larvas de *T. molitor* fueron inyectadas con 0.5 µg de dsRNA previo a la administración de una dosis letal de Baculovirus. El porcentaje en la gráfica indica la proporción de insectos muertos al cabo de 7 días. La inyección de las larvas infectadas con una solución de X-gal resulta en una coloración azul-verdosa después de unas horas. La expresión de β-galactosidasa es derivada de la infección.

Dada la eficiencia del dsRNA-ie1 para interferir con la infección viral de Baculovirus, nos preguntamos si el dsRNA homólogo a GFP estaría inhibiendo la traducción de la proteína GFP en las larvas. El dsRNA-gfp había demostrado no interferir con el curso de la infección *in vitro* o *in vivo*.

Para verificar si las larvas expresaban o no GFP se utilizó microscopía confocal con baja amplificación de las larvas infectadas con AcMNPV-GFP. Como puede verse en la figura 15B, las larvas infectadas con AcMNPV-GFP tienen una fluorescencia en el canal verde correspondiente a GFP. Por su parte, las larvas a las que previamente se les inyectaron 0.5 µg de dsRNA-gfp no presentan fluorescencia (Fig. 15C).

Las larvas a las que fueron tratadas con dsRNA-*ie1* también mostraron un patrón de fluorescencia igual al de las larvas que no fueron infectadas (Fig. 15D y 15A). Esto presumiblemente por la inhibición de la infección viral.



**Figura 15.- Microscopia confocal** de larvas de *Tenebrio molitor* expresando GFP. A) Control, larva inyectada con agua. B) AcMNPV-GFP: larva inyectada con agua y luego con una dosis letal de AcMNPV-GFP. C) larva inyectada con dsRNA-gfp y luego infectada con AcMNPV-GFP. D) larva inyectada con dsRNA-*ie1* y luego infectada con AcMNPV-GFP.

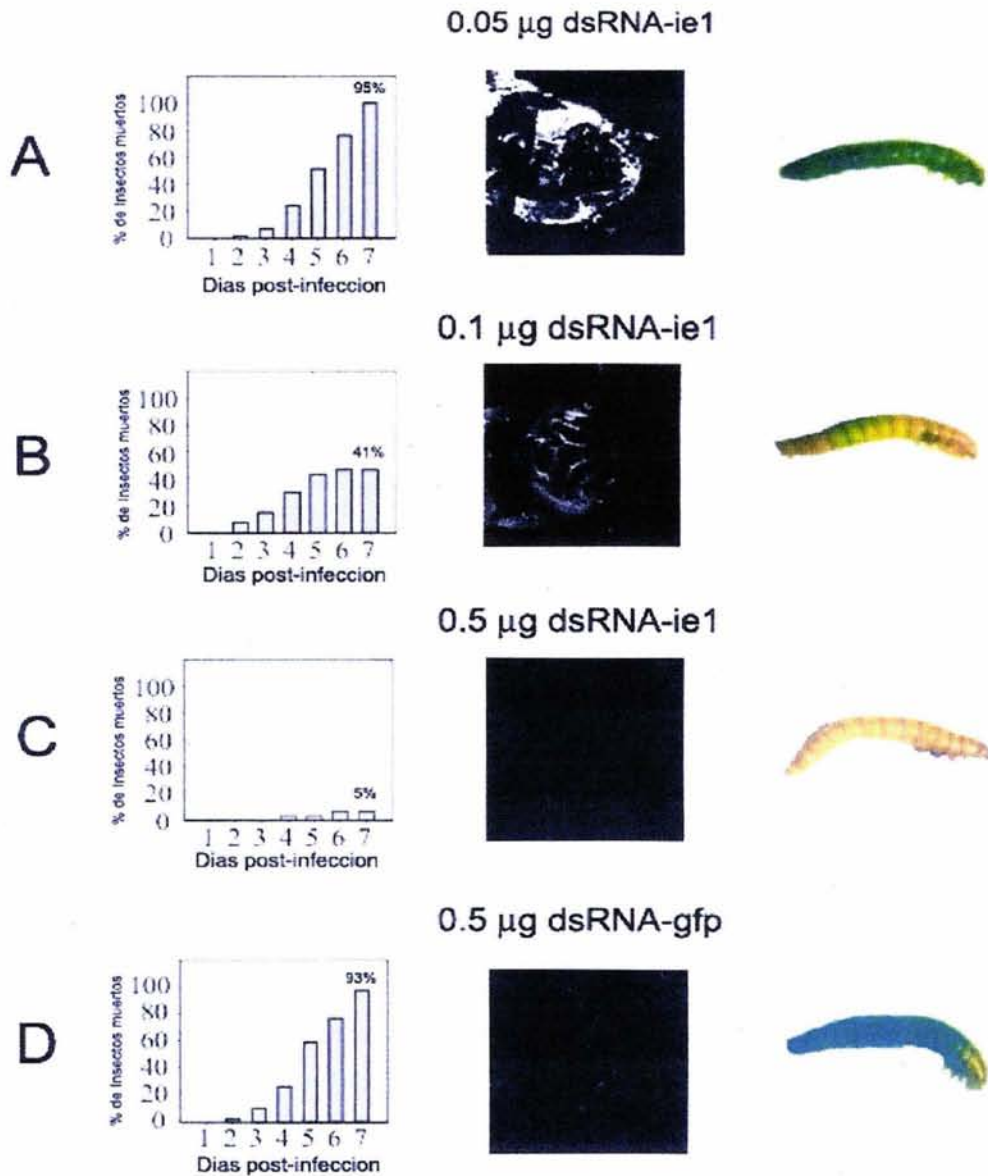
Por último, era importante evaluar la dosis necesaria para interferir la infección en las larvas. Para esto se inyectaron insectos con distintas concentraciones de dsRNA-*ie1* previo a la infección con AcMNPV-GFP.

El 95% de las larvas inyectadas con 0.05  $\mu$ g de dsRNA-*ie1* habían muerto al cabo de 7 días post-infección. (Fig. 16A). Por su parte, sólo el 41% de las larvas que recibieron una dosis de 0.1  $\mu$ g de dsRNA-gfp habían muerto en el mismo periodo de tiempo (Fig. 16B). La inyección de 0.5  $\mu$ g de dsRNA previno la muerte en el 95% de las larvas ya que a los 7 días sólo presentaban signos de infección el 5% de los insectos (Fig 16C).

Estos resultados correlacionaron con la presencia o no de GFP o  $\beta$ -galactosidasa (figura 16).

El hecho de que dosis bajas de dsRNA-*ie1* no fueran efectivas para prevenir o detener la infección de AcMNPV-GFP, nos habla de que este es un mecanismo específico y no un fenómeno indirecto de inyectar dsRNA al insecto.





**Figura16.- Dosis Respuesta.** Larvas de *Tenebrio molitor* inyectadas con A) 0.05  $\mu\text{g}$  de dsRNA-ie1, B) 0.1  $\mu\text{g}$  de dsRNA-ie1, C) 0.5  $\mu\text{g}$  dsRNA-ie1, D) 0.5  $\mu\text{g}$  dsRNA-gfp previo a la inyección de una dosis letal de AcMNPV-GFP. Los porcentajes en las gráficas indican la cantidad de insectos muertos al cabo de 7 días. En el panel de en medio se muestra microscopía confocal de los mismo animales para detectar GFP. A la derecha se muestran insectos inyectados con X-Gal. A) n = 60. B) n = 48. C) n = 40. D) n = 42.

## CONCLUSIONES

---

En este trabajo hemos demostrado por distintos métodos la inhibición específica de 2 genes virales de Baculovirus con RNAi en células de insecto. Todos los resultados obtenidos *in vitro* se extrapolan al modelo animal de larva de *Tenebrio molitor*.

Sobre la base de los resultados obtenidos también concluimos que el efecto de silenciamiento observado es por la vía del RNAi. Esto debido a que el RNA de hebra sencilla (ssRNA) no tuvo ningún efecto en la inhibición de la traducción; ni siquiera el ssRNA antisentido. Por otro lado la introducción de siRNA-gfp tuvo el mismo efecto al interferir el gen de GFP que el dsRNA-gfp; los siRNA se han definido como los efectores del fenómeno de RNAi en distintos organismos.

El indicativo de que se trata de un efecto postranscripcional y no pretraduccional es el hecho que solo los dsRNA homólogos a regiones codificantes tuvieron efecto y no así el dsRNA homólogo a regiones reguladores (como el promotor de la polihedrina usado en este trabajo). Los dsRNA homólogos a RNA mensajeros abaten la presencia de éstos en la célula, como demostramos por RT-PCR, y los niveles de proteína decaen, como mostramos por análisis de Western blot.

El efecto de silenciamiento postranscripcional mediado por dsRNA ha sido caracterizado como un evento exclusivo del citoplasma<sup>152</sup>; mediante la transfección de dsRNA fluorescente pudimos corroborar que su localización es exclusiva al citoplasma. Por todo lo anterior, concluimos que estamos ante un fenómeno de RNA de interferencia.

La inhibición de la expresión de genes en todos los casos resultó altamente específica, esto se explica por la necesidad de un apareamiento perfecto entre las bases del dsRNA y el mRNA. A este respecto; dsRNA-gfp sólo interfirió con el mensajero de la proteína fluorescente verde, pero no así con la expresión del gen de  $\beta$ -galactosidasa ni con la infección viral, ya que GFP es dispensable para el progreso de ésta última. Por otro lado, los dsRNA no relacionados no mostraron ningún efecto en la infección viral ni indujeron una respuesta antiviral inespecífica. dsRNA-gfp, o -promotor de polihedrina no inhibieron el progreso de la infección viral una vez iniciada. Los únicos dsRNA que lograron detener la infección fueron el homólogo al factor temprano de transcripción viral IE1 y GP64.

La inhibición de la infección viral mediada por dsRNA-ie1 nos permitió comprobar que es posible la inhibición de una infección viral vía RNAi, de un virus altamente citolítico como lo es el Baculovirus.

El efecto inhibitor del dsRNA es dosis dependiente: a bajas MOI, el efecto de interferencia fue logrado para todos los genes explorados (ie1, gfp, y gp64). Sin embargo a altas MOI la maquinaria de duplicación viral sobrepasa el efecto inhibitor del dsRNA; una célula infectada con una sola partícula viral de AcMNPV-GFP genera miles de copias del genoma viral en un lapso de entre 24 y 48 horas. El dsRNA-ie1 fue más efectivo, incluso a altas MOI, en comparación con los dsRNA-gfp y -gp64 puesto que está previniendo la amplificación y multiplicación del virus.



En el modelo *in vivo* también se observó un efecto dosis-dependiente del dsRNA-*ie1*: 0.01 µg de dsRNA no inhibió la infección por Baculovirus; el 50% de inhibición se logró con 0.1 µg y fue necesario inyectar 0.5 µg de dsRNA para inhibir por completo la infección. Este resultado, aunado a la especificidad para inhibir GFP y no la infección viral, corrobora que estamos ante un efecto específico, altamente eficiente y al menos en larvas de *Tenembior mollitor*, un efecto de protección sistémica.

Asimismo pudimos observar un prolongado efecto protector del dsRNA: a los 7 días de haber transfectado células Sf21 con dsRNA-*gfp*, se logró una inhibición del 50% en la expresión de GFP. Distintos autores han hablado acerca de que los siRNA una vez en el citoplasma son en extremo estables y resistentes a RNasas inespecíficas<sup>76,85,153,154</sup>. Pareciera que el efecto del dsRNA se diluye conforme se dividen las células en el cultivo, lo cual podría explicar el porque después de 7 días disminuye el efecto protector del dsRNA.

Un resultado que hasta cierto punto no era esperado, fue el hecho de que las células transfectadas con dsRNA-*gp64* tuvieran una marcada disminución en el título viral de sus sobrenadantes. dsRNA-*gp64* no interfirió la infección viral una vez iniciada en las células infectadas. Esto se corroboró por distintas metodologías -microscopia confocal, ensayos de β-galactosidasa o la supervivencia de las células. El hecho de que las células hayan presentado signos de infección, pero que no liberaran virus al medio extracelular fue inesperado. Nosotros esperábamos un número igual de virus GP64 negativos en los sobrenadantes. Esto sugiere que quizás GP64 no sólo es esencial para que los virus gemados entren a otra célula y escapen del endosoma tardío, sino que también es necesaria en algún punto de la biogénesis final de los virus para su salida de la célula infectada. En que paso exacto es esencial GP64 para que los virus abandonen la célula huésped es algo que aun falta por determinar.

## DISCUSIÓN

---

### EL RNAi COMO UNA ALTERNATIVA A LA GENÉTICA REVERSA EN BACULOVIRUS.

Baculovirus tiene un genoma grande y complejo con una gran cantidad de marcos de lectura abiertos y muchas proteínas de función desconocida. La genética reversa en un virus como éste es una metodología lenta y tecnológicamente complicada. A esto se le suma el hecho de que en ocasiones la eliminación de genes producen virus no replicativos y que, por lo tanto, no pueden ser estudiados. Ejemplo de ello es el caso de IE1 y GP64: la generación de Baculovirus que carecen de estos genes resultan en virus no infectivos y que sólo pueden ser amplificados en células de insecto que expresan dichas proteínas mediante plásmidos transfectados<sup>150,155</sup>.

En el caso de GP64, este tipo de metodologías imposibilitó los estudios del papel que juega esta glicoproteína fuera de la entrada del virus a la célula hospedero. Por medio de RNAi, identificamos que GP64 está involucrada en la biogénesis de los virus. Para esto infectamos células de insecto con el Baculovirus recombinante AcMNPV-GFP que es fácil de producir y amplificar. Estos virus llevan una copia silvestre de GP64 y el gen nativo que produce esta proteína. Las células infectadas previamente habían sido transfectadas con dsRNA homólogo a GP64. Esto inhibió la síntesis de GP64 vía RNAi durante el proceso de infección. Contrario a lo que esperábamos, no fuimos capaces de identificar virus en los sobrenadantes de las células infectadas.

Este resultado nos lleva a sugerir que la glicoproteína GP64 no sólo está involucrada en la entrada de los virus a las células de insecto como previamente se había demostrado<sup>155</sup>, sino que también juega un papel en la biogénesis final de los virus, por ejemplo, permitiéndoles salir de la célula infectada o a que GP64 está desempeñando algún otro papel esencial en la biogénesis de los virus. Esto es una función completamente nueva para esta proteína. Aunque aún hace falta mucho trabajo para identificar exactamente el paso en el que GP64 está participando, este tipo de metodologías pueden ser aplicadas de manera fácil, eficiente y rápida para estudiar otras proteínas de Baculovirus para las cuales se desconoce su función. Incluso se podrían generar “screenings” automatizados para abarcar un gran número de proteínas.

Así pues, el RNAi demostró ser una excelente alternativa a la genética reversa clásica en Baculovirus dadas sus características de facilidad, rapidez y efectividad. Una ventaja adicional es que nos permitió trabajar con los virus silvestres, simplificándose el manejo de los virus. Por otro lado la transfección de células de insecto resultó extremadamente eficiente como pudimos observar por microscopía confocal. También se corroboró la estabilidad del dsRNA dentro del citoplasma: los dsRNA fluorescentes fueron observados dentro de las células aún 7 días después de haber sido transfectados y, aunque la señal disminuyó con el tiempo, no podemos descartar que se deba a un efecto de dilución o foto blanqueo del fluoróforo.

Nosotros utilizamos dsRNA mayores a 21 nucleótidos (gfp: 700 nt; gp64:619 nt; ie1: 450 nt) ya que en células de insecto el dsRNA mayor a 30 nucleótidos no induce un



apagamiento inespecífico de la síntesis protéica mediado por la cascada de interferón tal y como ocurre en células de mamíferos<sup>156</sup>. El utilizar dsRNA en vez de siRNAs, facilitó la tarea de producir grandes cantidades de dsRNA mediante una reacción de transcripción *in vitro*. En una típica reacción de transcripción *in vitro* hecha en el laboratorio se obtienen de entre 40 y 60 µg de dsRNA. Por otro lado, el usar una molécula grande de dsRNA tiene la ventaja de generar una enorme cantidad de siRNA después de que ésta es procesada por Dicer, por ejemplo; a partir de una sola molécula de dsRNA-gfp de 700 nt, se producen más de 30 siRNAs en la célula. Lo anterior necesariamente multiplica los blancos del dsRNA para un mismo mensajero, asegurando su eficiencia para inducir una reacción de RNAi.

Otra forma de incrementar la respuesta de RNAi es la mediada por RNA polimerasas dependientes de dsRNA, sin embargo, se encuentra en duda que dichas polimerasas existan en insecto,<sup>157,158</sup> de acuerdo a estudios conflictivos reportados en *Drosophila*<sup>159</sup>.

## EL RNAi Y LA VALIDACIÓN DE BLANCOS TERAPÉUTICOS.

El primer paso para identificar buenos agentes antivirales consiste en determinar qué proteínas son esenciales para el progreso de la infección, este tipo de proteínas son considerados como blancos terapéuticos. Una vez identificado un blanco terapéutico se inicia la búsqueda y el diseño de fármacos que lo inhiban de manera específica y de esta manera bloqueen la infección viral. Dada la complejidad de muchos virus y del proceso viral en sí, el identificar blancos terapéuticos es un proceso lento y complicado.

Con base en el punto anterior, el RNAi parece ser una herramienta invaluable. En esta tesis corroboramos que el factor temprano de transcripción IE1 de Baculovirus es esencial para el progreso de la infección en insecto. Esto mediante la transfección de células de insecto con dsRNA homólogo a *ie1* previo a la infección de AcMNPV-GFP. La interferencia vía RNAi de esta única proteína fue suficiente para detener la infección viral de Baculovirus. Lo que demuestra de manera muy clara, la importancia de esta proteína y el papel maestro que tiene para controlar, e iniciar, la cascada de eventos que resultan en la infección por Baculovirus. Dicho resultado también corrobora que IE1 es un blanco terapéutico que sería un candidato excelente para el diseño de una droga específica. Dado esto, sería plausible y justificable, el diseñar una molécula que inhiba de manera específica a IE1 y que, por lo tanto, detenga la infección de Baculovirus.

Este tipo de estrategia podría automatizarse para distintos virus como un sistema de "screening" genérico; con tan sólo conocer la secuencia de los diferentes genes de cualquier virus, uno podría eliminarlos uno a uno, de manera sistemática, con el fin de identificar genes esenciales para la virulencia. Esta forma automatizada de "*target validation*" permitiría posteriormente iniciar la síntesis de compuestos que afecten la función de la proteína codificada por los genes identificados mediante esta estrategia.



## EL RNAi COMO TERAPIA ANTIVIRAL

Dados nuestros resultados para inhibir genes virales y el progreso de la infección de Baculovirus con RNAi, nos dimos a la tarea de probar si la misma inhibición que observamos en las células de insecto sería efectiva *in vivo* y en el caso de que esto ocurriera, si la inhibición de la síntesis de IE1 detendría también el progreso de la infección viral.

Para esto inyectamos el dsRNA en larvas del escarabajo *Tenebrio molitor*, previo a la infección con el Baculovirus recombinante AcMNPV-GFP.

Como demostramos, por primera vez, el uso de dsRNA homólogo a genes esenciales para la infección de un virus animal altamente citotóxico previene la infección viral *in vivo*: el dsRNA-ie1 inyectado en los animales un día antes de la infección con Baculovirus previno la muerte en más del 96% de los casos. Este tipo de protección antiviral tan efectiva no ha sido reportada hasta hoy día para ningún agente antiviral.

Este efecto de protección es dosis-dependiente a la cantidad de dsRNA inyectado: 0.5  $\mu$ g de dsRNA logró inhibir por completo el progreso de la infección de AcMNPV-GFP, mientras que 0.1  $\mu$ g sólo protegió al 50% de las larvas. En algunos organismos se ha reportado que la interacción con un RNA viral puede conferir cierta inmunidad a ciertas infecciones virales<sup>160,161</sup>. Esta protección es inespecífica y se debe más que nada a mecanismos de defensa innatos de la célula. Sin embargo, este no es el caso de nuestro modelo puesto que la inyección de dsRNA-gfp no detuvo la infección viral como pudimos constatar por la muerte de las larvas y a la presencia de  $\beta$ -galactosidasa; el segundo gen reportero presente en el Baculovirus recombinante. El único efecto del dsRNA-gfp fue la inhibición específica del gen reportero GFP en los insectos infectados

Otro hecho importante es que el efecto fue sistémico: una sola inyección en la hemolinfa (el sistema hematopoyético del insecto) protegió a la larva de la infección de Baculovirus en todo el organismo. El dsRNA fue inyectado sin la ayuda de ningún lípido, por lo que suponemos que el dsRNA entró al interior de las células del insecto por algún tipo de transporte aún no identificado. En *C. elegans* han sido identificadas proteínas capaces de mediar la entrada de dsRNA a las células y que también son necesarias para el efecto sistémico del RNAi en el nemátodo<sup>162</sup>. Un ejemplo de estas proteínas es SID-1; una proteína tipo canal que media el transporte de dsRNA<sup>163</sup>. En insectos no se han identificado homólogos de SID-1, por lo que el mecanismo de entrada aun queda por determinarse.

En este trabajo la administración del dsRNA fue, en todos los casos, previa a la infección, es decir, se trata más de un efecto preventivo – tipo vacuna– que de una eliminación de la infección. A este respecto harán falta más experimentos para determinar la eficiencia del RNAi para inhibir una infección viral ya iniciada o preestablecida. Nosotros creemos que es posible la eliminación de una infección viral ya iniciada, pero que habrá que maximizar la cantidad de dsRNA introducido, optimizar su administración y escoger un blanco esencial para el progreso de la infección. -como IE1- Hay que tomar en cuenta que el detener una infección viral en etapas tardías podría ser mucho más difícil que al inicio. No obstante, se debe considerar que frecuentemente el objetivo de las terapias antivirales no es el eliminar al virus de una célula ya infectada, sino el detener la reinfección de células u órganos vecinos. Sobre este punto, los resultados obtenidos en esta tesis son prometedores



con respecto a la posibilidad de usar al RNAi como una terapia antiviral dadas sus características.

Otra opción para utilizar al RNAi en el combate de infecciones virales es la generación de organismos transgénicos que expresen un dsRNA (o siRNA) homólogo a algún gen esencial para la virulencia de cierto virus, lo que los haría inmunes a la infección de éste. No cuesta trabajo imaginar el enorme impacto de este tipo de metodologías en la industria alimenticia, sobretodo tomando en cuenta las recientes epidemias de virus aviares como la influenza aviar, el SARS o los virus vegetales que afectan diversos cultivos.

En el diseño de fármacos en contra de agentes infecciosos de cualquier tipo, siempre hay que tomar en cuenta que se está lidiando con organismos vivos en constante evolución. En el caso de los virus esto es especialmente significativo ya que, en general, la DNA polimerasa viral (o Transcriptasa Reversa que duplica la información genética en el caso de los retrovirus) tienen altas tasas de mutación<sup>164,165</sup>. El resultado es una enorme diversidad y variabilidad en las secuencias de los genomas virales. Esto tiene la repercusión de que cada vez que se genere un dsRNA en contra de un virus, puedan aparecer virus inmunes con el paso del tiempo. Dicho problema puede ser en parte resuelto utilizando dsRNA homólogos a regiones en extremo conservadas del genoma viral. Otra opción puede ser la generación de vectores que expresen varios siRNA diferentes a la vez, cuyo blanco sean distintas regiones de mRNAs o distintas proteínas virales. Con esto sin duda se maximizaría el efecto antiviral y se prolongaría su eficiencia.

## Perspectivas

---

El RNAi ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para bloquear la traducción de una proteína: cantidades mínimas de dsRNA tienen un efecto impresionante. Por otro lado, el utilizar dsRNA para inhibir genes ha resultado exquisitamente específico ya que su efecto depende de un apareamiento perfecto entre las bases del siRNA y el mRNA. Una alta especificidad y efectividad, son dos de los requisitos más importantes que debe cumplir una droga que vaya a ser utilizada para tratar cualquier enfermedad. Otra de las características con las que un fármaco debe cumplir es que su administración sea eficiente y su distribución sistémica. En esta tesis, se demostró que el RNAi cumple con estos requisitos y por lo tanto, este es un trabajo pionero en donde se demuestra la factibilidad para utilizar al RNAi para inhibir infecciones virales en animales.

El RNAi se perfila como uno de los descubrimientos más importantes de los últimos diez años y seguramente, tendrá un profundo impacto en las próximas décadas. La inhibición de genes vía RNAi parece ser la herramienta que complementa los proyectos de secuenciación de genomas para caracterizar la función de cada gen codificado. El campo de las ciencias médicas sin duda será uno de los más beneficiados de las tecnologías con base en RNAi. En virología, el contar con una evidencia experimental que justifique la búsqueda de una molécula inhibitoria para determinada proteína viral representa un avance considerable en la investigación y diseño de agentes antivirales. El RNAi también ofrece una posibilidad para el tratamiento para muchas enfermedades para las cuales no se tiene opción real de curación: cáncer, enfermedades neurodegenerativas, rechazo de trasplantes entre otras. Aún hace falta mucho trabajo para desarrollar tratamientos en base a RNAi y que estos puedan ser una opción terapéutica. El éxito del RNAi como terapia dependerá en gran parte de desarrollar métodos eficientes para su administración en humanos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que ésta pudiera no ser la primera vez que una metodología prometiera ser la solución para distintos padecimientos, para luego mostrar sus limitaciones y problemas.

Finalmente, sólo me resta mencionar que el RNAi es un ejemplo en donde un descubrimiento que pudiera parecer de “poca relevancia” o “demasiado complicado y misterioso” como fue el efecto de cosupresión en plantas o que el dsRNA era capaz de silenciar genes en un gusano milimétrico, eran en realidad la punta del iceberg que abrió las puertas al complejo fenómeno de silenciamiento postranscripcional mediado por RNA de doble hebra. No habrá que olvidar nunca que las repercusiones en la medicina, la ciencia y la biotecnología que tenga el RNAi, provienen en sus orígenes de la más pura ciencia básica.



## REFERENCIAS

1. Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G.V. & Wilson, J.A. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *J Gen Virol* **78**, 3091-100 (1997).
2. Crook, N.E. & Jarrett, P. Viral and bacterial pathogens of insects. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **20**, 91S-96S (1991).
3. Blissard, G.W. & Rohrmann, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol* **35**, 127-55 (1990).
4. Blissard, G.W. & Wenz, J.R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* **66**, 6829-35 (1992).
5. Kool, M. & Vlak, J.M. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Arch Virol* **130**, 1-16 (1993).
6. Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. & Possee, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 586-605 (1994).
7. Rasmussen, C., Leisy, D.J., Ho, P.S. & Rohrmann, G.F. Structure-function analysis of the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus homologous region palindromes. *Virology* **224**, 235-45 (1996).
8. Summers, M.D. & Volkman, L.E. Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from *in vivo* and *in vitro* host systems. *J Virol* **17**, 962-72 (1976).
9. Pearson, M.N., Russell, R.L. & Rohrmann, G.F. Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virology* **291**, 22-31 (2001).
10. Wilson, M.E., Mainprize, T.H., Friesen, P.D. & Miller, L.K. Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *J Virol* **61**, 661-6 (1987).
11. Wykes, S.M. & Krawetz, S.A. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* **278**, 29471-7 (2003).
12. Yamagishi, J., Isobe, R., Takebuchi, T. & Bando, H. DNA microarrays of baculovirus genomes: differential expression of viral genes in two susceptible insect cell lines. *Arch Virol* **148**, 587-97 (2003).
13. Monsma, S.A., Oomens, A.G. & Blissard, G.W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* **70**, 4607-16 (1996).
14. Volkman, L.E. & Zaal, K.J. *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus: microtubules and replication. *Virology* **175**, 292-302 (1990).
15. Roncarati, R. & Knebel-Morsdorf, D. Identification of the early actin-rearrangement-inducing factor gene, arif-1, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **71**, 7933-41 (1997).
16. Kitts, P.A. Production of recombinant baculoviruses using linearized viral DNA. *Methods Mol Biol* **39**, 129-42 (1995).
17. Kogan, P.H. & Blissard, G.W. A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. *J Virol* **68**, 813-22 (1994).
18. Nissen, M.S. & Friesen, P.D. Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J Virol* **63**, 493-503 (1989).
19. Carson, D.D., Summers, M.D. & Guarino, L.A. Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology* **182**, 279-86 (1991).
20. Bilimoria, S.L., Demirbag, Z. & Ng, H. Host-specific transcription of baculovirus genes. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* **6**, 1-7 (1993).
21. Guarino, L.A. & Smith, M. Regulation of delayed-early gene transcription by dual TATA boxes. *J Virol* **66**, 3733-9 (1992).
22. McDougal, V.V. & Guarino, L.A. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase: measurements of processivity and strand displacement. *J Virol* **73**, 4908-18 (1999).
23. McDougal, V.V. & Guarino, L.A. The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p143 gene encodes a DNA helicase. *J Virol* **74**, 5273-9 (2000).
24. Choi, J. & Guarino, L.A. Expression of the IE1 transactivator of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus during viral infection. *Virology* **209**, 99-107 (1995).
25. Leisy, D.J. & Rohrmann, G.F. The *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus IE-1 protein complex has two modes of specific DNA binding. *Virology* **274**, 196-202 (2000).
26. Charlton, C.A. & Volkman, L.E. Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol* **65**, 1219-27 (1991).
27. Eldridge, R., Li, Y. & Miller, L.K. Characterization of a baculovirus gene encoding a small conotoxinlike polypeptide. *J Virol* **66**, 6563-71 (1992).
28. Seshagiri, S., Vucic, D., Lee, J. & Dixit, V.M. Baculovirus-based genetic screen for antiapoptotic genes identifies a novel IAP. *J Biol Chem* **274**, 36769-73 (1999).



29. Wang, Y., Qi, Y., Zhu, Y., Li, Z. & Yang, Y. Functional study on baculovirus anti-apoptosis genes. *Mol Cell Biochem* **252**, 103-7 (2003).
30. Rabizadeh, S., LaCount, D.J., Friesen, P.D. & Bredesen, D.E. Expression of the baculovirus p35 gene inhibits mammalian neural cell death. *J Neurochem* **61**, 2318-21 (1993).
31. Yoo, S. & Guarino, L.A. The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ie2 gene encodes a transcriptional regulator. *Virology* **202**, 746-53 (1994).
32. Kovacs, G.R., Guarino, L.A. & Summers, M.D. Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **65**, 5281-8 (1991).
33. Miller, L.K. Insect Viruses. in *Virology*, Vol. 1 (ed. Fields B. N, K.D.M., Howley P.M et all.) Chapter 18. p 533-544 (Pincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).
34. Guarino, L.A. Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 409-13 (1990).
35. Tomalski, M.D., Eldridge, R. & Miller, L.K. A baculovirus homolog of a Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Virology* **184**, 149-61 (1991).
36. Blissard, G.W. & Rohrmann, G.F. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **170**, 537-55 (1989).
37. Rashidan, K.K., Nassoury, N., Tazi, S., Giannopoulos, P.N. & Guertin, C. Choristoneura fumiferana Granulovirus p74 protein, a highly conserved baculoviral envelope protein. *J Biochem Mol Biol* **36**, 475-87 (2003).
38. Kuzio, J., Jaques, R. & Faulkner, P. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* **173**, 759-63 (1989).
39. Huh, N.E. & Weaver, R.F. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **71**, 195-201 (1990).
40. Ooi, B.G. & Miller, L.K. Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. *Virology* **166**, 515-23 (1988).
41. Weyer, U., Knight, S. & Possee, R.D. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors. *J Gen Virol* **71**, 1525-34 (1990).
42. Van Oers, M.M., Flipsen, J.T., Reusken, C.B. & Vlak, J.M. Specificity of baculovirus p10 functions. *Virology* **200**, 513-23 (1994).
43. Patmanidi, A.L., Possee, R.D. & King, L.A. Formation of P10 tubular structures during AcMNPV infection depends on the integrity of host-cell microtubules. *Virology* **317**, 308-20 (2003).
44. Morris, T.D. & Miller, L.K. Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. *Gene* **140**, 147-53 (1994).
45. Richardson, C.D. *Baculovirus Expression Protocols*, 1-23 (Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1995).
46. Chukhry, M.G. The process of baculovirus deproteinization. in *Acta Virol* **33** 559-64 (1989).
47. Keddie, B.A., Aponte, G.W. & Volkman, L.E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. in *Science* **243** 1728-30 (1989).
48. Engelhard, E.K., Kam-Morgan, L.N., Washburn, J.O. & Volkman, L.E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3224-7 (1994).
49. Keddie, B.A., Aponte, G.W. & Volkman, L.E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* **243**, 1728-30 (1989).
50. O'Reilly, D.R. & Miller, L.K. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* **245** 1110-2 (1989)
51. Park, E.J., Yin, C.M. & Burand, J.P. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. in *J Gen Virol* **77**, 547-54 (1996).
52. Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. & McCawley, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). in *In Vitro* **13**, 213-7 (1977).
53. Pennock, G.D., Shoemaker, C. & Miller, L.K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. in *Mol Cell Biol* **4**, 399-406 (1984).
54. Matsuura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A. & Bishop, D.H. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. in *J Gen Virol* **68**, 1233-50 (1987).
55. Han, J. et al. Expression of a novel recombinant dual human stem cell factor in insect cells. in *Protein Expr Purif* **31**, 311-7 (2003).
56. Luckow, V.A. & Summers, M.D. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. in *Virology* **167**, 56-71 (1988).



57. Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P. & Milon, A. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. in *Cell Mol Life Sci* **60**, 1529-46 (2003).
58. Kunze, D.L., Sinkins, W.G., Vaca, L. & Schilling, W.P. Properties of single *Drosophila* Trp1 channels expressed in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* **272**, C27-34 (1997).
59. Massotte, D. G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: a tool for structural and functional studies. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 77-89 (2003).
60. Pieroni, L. & La Monica, N. Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector. *Curr Opin Mol Ther* **3**, 464-7 (2001).
61. Hu, Y.C., Tsai, C.T., Chang, Y.J. & Huang, J.H. Enhancement and prolongation of baculovirus-mediated expression in mammalian cells: focuses on strategic infection and feeding. *Biotechnol Prog* **19**, 373-9 (2003).
62. Liang, C.Y., Wang, H.Z., Li, T.X., Hu, Z.H. & Chen, X.W. High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. *Arch Virol* **149**, 51-60 (2004).
63. Grabherr, R., Ernst, W., Oker-Blom, C. & Jones, I. Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends Biotechnol* **19**, 231-6 (2001).
64. Ojala, K., Mottershead, D.G., Suokko, A. & Oker-Blom, C. Specific binding of baculoviruses displaying gp64 fusion proteins to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 777-84 (2001).
65. Waterhouse, P.M. & Helliwell, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* **4**, 29-38 (2003).
66. Maine, E.M. A conserved mechanism for post-transcriptional gene silencing? *Genome Biol* **1**, 156-9 (2000).
67. Boutros, M. et al. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* **303**, 832-5 (2004).
68. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
69. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289 (1990).
70. Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J., Que, Q. & Napoli, C.A. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* **31**, 957-73 (1996).
71. Que, Q. & Jorgensen, R.A. Homology-based control of gene expression patterns in transgenic petunia flowers. *Dev Genet* **22**, 100-9 (1998).
72. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11 (1998).
73. Sijen, T. et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-76 (2001).
74. Schiebel, W. et al. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**, 2087-101 (1998).
75. Smardon, A. et al. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* **10**, 169-78 (2000).
76. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 457-67 (2003).
77. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6 (2001).
78. Myers, J.W., Jones, J.T., Meyer, T. & Ferrell, J.E., Jr. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol* **21**, 324-8 (2003).
79. Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R. & Bertrand, E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* **31**, 6593-7 (2003).
80. Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. & Hannon, G.J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146-50 (2001).
81. Song, J.J. et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* **10**, 1026-32 (2003).
82. Caudy, A.A. et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**, 411-4 (2003).
83. Mourelatos, Z. et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**, 720-8 (2002).
84. Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. & Hammond, S.M. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* **16**, 2491-6 (2002).
85. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-97 (2004).
86. Hutvagner, G. & Zamore, P.D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 225-32 (2002).



87. Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001).
88. Waterhouse, P.M., Wang, M.B. & Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-42 (2001).
89. Wang, Q.C., Nie, Q.H. & Feng, Z.H. RNA interference: antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* **9**, 1657-61 (2003).
90. Mourrain, P. et al. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533-42 (2000).
91. Mallory, A.C. et al. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13**, 571-83 (2001).
92. Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C. & Maule, A.J. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **306**, 33-41 (2003).
93. Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. & Grewal, S.I. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**, 110-3 (2001).
94. Schneider, R. et al. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* **6**, 73-7 (2004).
95. van Leeuwen, F. & Gottschling, D.E. Genome-wide histone modifications: gaining specificity by preventing promiscuity. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 756-62 (2002).
96. Berger, S.L. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 142-8 (2002).
97. Jenuwein, T. & Allis, C.D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80 (2001).
98. Horvath, J.E., Bailey, J.A., Locke, D.P. & Eichler, E.E. Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. *Hum Mol Genet* **10**, 2215-23 (2001).
99. Grewal, S.I. & Moazed, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* **301**, 798-802 (2003).
100. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21 (2002).
101. Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. & Matzke, A.J. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* **19**, 5194-201 (2000).
102. Wassenegger, M. RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol* **43**, 203-20 (2000).
103. Dawe, R.K. RNA interference, transposons, and the centromere. *Plant Cell* **15**, 297-301 (2003).
104. Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. & Vaucheret, H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11650-4 (2000).
105. Glazov, E., Phillips, K., Budziszewski, G.J., Meins, F., Jr. & Levin, J.Z. A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant J* **35**, 342-9 (2003).
106. Morel, J.B. & Vaucheret, H. Post-transcriptional gene silencing mutants. *Plant Mol Biol* **43**, 275-84 (2000).
107. Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G. & Plasterk, R.H. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**, 133-41 (1999).
108. Knight, S.W. & Bass, B.L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **293**, 2269-71 (2001).
109. Tabara, H. et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-32 (1999).
110. Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. & Mello, C.C. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* **109**, 861-71 (2002).
111. Allshire, R. Molecular biology. RNAi and heterochromatin--a hushed-up affair. *Science* **297**, 1818-9 (2002).
112. Volpe, T. et al. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res* **11**, 137-46 (2003).
113. Volpe, T.A. et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**, 1833-7 (2002).
114. Dernburg, A.F. & Karpen, G.H. A chromosome RNAissance. *Cell* **111**, 159-62 (2002).
115. Doench, J.G., Petersen, C.P. & Sharp, P.A. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* **17**, 438-42 (2003).
116. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. & Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21**, 4663-70 (2002).
117. Lai, E.C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* **30**, 363-4 (2002).
118. Ambros, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* **113**, 673-6 (2003).
119. Lee, R.C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862-4 (2001).



120. Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. & Cohen, S.M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36 (2003).
121. Hake, S. MicroRNAs: a role in plant development. *Curr Biol* **13**, R851-2 (2003).
122. Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K. & Kosik, K.S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* **9**, 1274-81 (2003).
123. Houbaviy, H.B., Murray, M.F. & Sharp, P.A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* **5**, 351-8 (2003).
124. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. & Bartel, D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**, 83-6 (2004).
125. Britten, R.J. & Davidson, E.H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* **165**, 349-57 (1969).
126. Timmons, L., Court, D.L. & Fire, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**, 103-12 (2001).
127. Kamath, R.S. & Ahringer, J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21 (2003).
128. Carpenter, A.E. & Sabatini, D.M. Systematic genome-wide screens of gene function. *Nat Rev Genet* **5**, 11-22 (2004).
129. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. & Schreiber, R.D. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-64 (1998).
130. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. & Williams, B.R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**, 834-9 (2003).
131. Zeng, Y., Wagner, E.J. & Cullen, B.R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* **9**, 1327-33 (2002).
132. Miyagishi, M. & Taira, K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **20**, 497-500 (2002).
133. Rubinson, D.A. et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**, 401-6 (2003).
134. Carmell, M.A., Zhang, L., Conklin, D.S., Hannon, G.J. & Rosenquist, T.A. Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* **10**, 91-2 (2003).
135. Sorensen, D.R., Leirdal, M. & Sioud, M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* **327**, 761-6 (2003).
136. Song, E. et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* **9**, 347-51 (2003).
137. Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G., Wolff, J.A. & Herweijer, H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* **32**, 107-8 (2002).
138. Kao, S.C., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S. & Tsai, L.H. BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem* **279**, 1942-9 (2004).
139. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**, 243-7 (2002).
140. Wilda, M., Fuchs, U., Wossmann, W. & Borkhardt, A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* **21**, 5716-24 (2002).
141. Hall, A.H. & Alexander, K.A. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. *J Virol* **77**, 6066-9 (2003).
142. Novina, C.D. et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* **8**, 681-6 (2002).
143. Coburn, G.A. & Cullen, B.R. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* **76**, 9225-31 (2002).
144. Gitlin, L., Karelsky, S. & Andino, R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* **418**, 430-4 (2002).
145. Jiang, M. & Milner, J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* **21**, 6041-8 (2002).
146. McCaffrey, A.P. et al. RNA interference in adult mice. *Nature* **418**, 38-9 (2002).
147. Peracchi, A. Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes. *Rev Med Virol* **14**, 47-64 (2004).
148. Scherer, L.J. & Rossi, J.J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol* **21**, 1457-65 (2003).
149. Kurreck, J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* **270**, 1628-44 (2003).
150. Kovacs, G.R., Choi, J., Guarino, L.A. & Summers, M.D. Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein. *J Virol* **66**, 7429-37 (1992).

151. Guarino, L.A. & Summers, M.D. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J Virol* **57**, 563-71 (1986).
152. Zeng, Y. & Cullen, B.R. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna* **8**, 855-60 (2002).
153. Hannon, G.J. RNA interference. *Nature* **418**, 244-51 (2002).
154. Zamore, P.D. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* **8**, 746-50 (2001).
155. Jarvis, D.L., Wills, L., Burow, G. & Bohlmeier, D.A. Mutational analysis of the N-linked glycans on Autographa californica nucleopolyhedrovirus gp64. *J Virol* **72**, 9459-69 (1998).
156. Hovanessian, A.G. The double stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon: dsRNA-PK. *J Interferon Res* **9**, 641-7 (1989).
157. Lipardi, C., Wei, Q. & Paterson, B.M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* **107**, 297-307 (2001).
158. Kennerdell, J.R., Yamaguchi, S. & Carthew, R.W. RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev* **16**, 1884-9 (2002).
159. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P.D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell* **10**, 537-48 (2002).
160. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8 (2001).
161. Cella, M. et al. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* **189**, 821-9 (1999).
162. Winston, W.M., Molodowitch, C. & Hunter, C.P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**, 2456-9 (2002).
163. Feinberg, E.H. & Hunter, C.P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* **301**, 1545-7 (2003).
164. Duffy, K.E. et al. Assessing the contribution of the herpes simplex virus DNA polymerase to spontaneous mutations. *BMC Infect Dis* **2**, 7-12 (2002).
165. Ji, J.P. & Loeb, L.A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA in vitro. *Biochemistry* **31**, 954-8 (1992).



## Using Double-stranded RNA to Prevent *in Vitro* and *in Vivo* Viral Infections by Recombinant Baculovirus\*

Received for publication, November 26, 2002, and in revised form, March 18, 2003  
Published, JBC Papers in Press, March 19, 2003, DOI 10.1074/jbc.M212039200

Victor Julian Valdes†, Alicia Sampieri‡, Jorge Sepulveda, and Luis Vaca§

From the Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City DF 04510, México

**Introduction of double-stranded RNA (dsRNA) into a wide variety of cells and organisms results in post-transcriptional depletion of the homologous endogenous mRNA. This well-preserved phenomenon known as RNA interference (RNAi) is present in evolutionarily diverse organisms such as plants, fungi, insects, metazoans, and mammals. Because the identification of the targeted mRNA by the RNAi machinery depends upon Watson-Crick base-pairing interactions, RNAi can be exquisitely specific. We took advantage of this powerful and flexible technique to demonstrate that selective silencing of genes essential for viral propagation prevents *in vitro* and *in vivo* viral infection. Using the baculovirus *Autographa californica*, a rapidly replicating and highly cytolytic double-stranded DNA virus that infects many different insect species, we show for the first time that introduction of dsRNA from *gp64* and *ie1*, two genes essential for baculovirus propagation, results in prevention of viral infection *in vitro* and *in vivo*. This is the first report demonstrating the use of RNAi to inhibit a viral infection in animals. This inhibition was specific, because dsRNA from the polyhedrin promoter (used as control) or unrelated dsRNAs did not affect the time course of viral infection. The most relevant consequences from the present study are: 1) RNAi offers a rapid and efficient way to interfere with viral genes to assess the role of specific proteins in viral function and 2) using RNAi to interfere with viral genes essential for cell infection may provide a powerful therapeutic tool for the treatment of viral infections.**

Introduction of double-stranded RNA (dsRNA)<sup>1</sup> into a wide variety of cells and organisms results in post-transcriptional depletion of the homologous endogenous mRNA (1). This well-preserved phenomenon known as RNA interference (RNAi) is present in evolutionarily diverse organisms such as plants,

fungi, insects, metazoans, and mammals (for review see Ref. 2). It is generally accepted that in plants RNAi may serve as a mechanism of defense against viral infections (3). The physiological role of RNAi in animals remains to be established, although possible roles in organism development, germ line fate, and host defenses against transposable elements and viruses have been suggested (4). In this regard, recent experimental evidence shows modulation of HIV-1 replication in human cell lines by exogenous dsRNA from several portions of the viral genome (5). In a different study, dsRNA conferred viral immunity in human cells against poliovirus (6).

Although the effect of dsRNA to prevent viral infections has been tested in cell lines, it remains to be established whether RNAi also works in organisms. To test this hypothesis we used a well-studied insect virus, the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV). This virus is a member of a group (family *Baculoviridae*) of large double-stranded DNA viruses that infect many different insect species (7). The AcNPV GP64 glycoprotein is a major component of the nucleocapsid of budded viruses (BV) and is required for BV entry into host cells by endocytosis (8). Thus, GP64 is a key element for cell-to-cell infection and virus propagation (8). Another gene essential for baculovirus proliferation produces the immediate early protein (IE1). This phosphoprotein regulates the transcription of early viral genes (9). Deletion of the N-terminal domain of IE1 results in the loss of transcriptional activation, and the resulting viruses cannot be replicated (9). Thus, these two proteins are excellent candidates to test if RNAi can prevent viral infection *in vitro* and *in vivo*.

Recombinant AcNPV in conjunction with *Spodoptera frugiperda* (*Sf9* and *Sf21*) insect cell lines have been extensively used for the heterologous expression of a wide variety of genes (7). We have produced a recombinant baculovirus containing the genes for the green fluorescent protein (GFP) and  $\beta$ -galactosidase (AcNPV-GFP), which we have used as reporters of cell infection in *Sf21* insect cells and larvae.

Because introduction of dsRNA results in powerful and selective gene silencing in different cells (including insect cells), one would expect that transfecting insect cells with dsRNA from *gp64* prior to virus exposure could prevent virus propagation, because the BV produced by dsRNA-treated cells would lack GP64 protein.

In agreement with this prediction, cells infected with AcNPV-GFP and previously transfected with dsRNA from a portion of *gp64* (dsRNA-*gp64*) do not show GFP fluorescence, and the GP64 protein could not be detected in the membrane of these cells. Because the very late polyhedrin promoter drives GFP production, the lack of GFP expression indicates that dsRNA treatment prevents viral infection in culture. Similar results were obtained with cells transfected with dsRNA from *ie1* (dsRNA-*ie1*). In this case the inhibition was even stronger as expected when interfering with the synthesis of a transcrip-

\* Part of this work was produced with equipment donated by the Alexander von Humboldt-Stiftung and was supported by a grant from Fundación Miguel Alemán (to L. V.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Both authors contributed equally to this work.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 525-622-5654; Fax: 525-622-5611; E-mail: lvaca@ifisiol.unam.mx.

§ The abbreviations used are: dsRNA, double-stranded RNA; RNAi, RNA interference; AcNPV-GFP, *A. californica* recombinant baculovirus carrying the GFP and  $\beta$ -galactosidase genes; GFP, green fluorescent protein; pfu, plaque-forming units; m.o.i., multiplicity of infection; *Sf21*, *S. frugiperda* 21 cell line; X-gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside; HIV-1, human immunodeficiency virus, type 1; BV, budded viruses; ONPG, o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; RT, reverse transcription; PhP, polyhedrin promoter.





## Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference

C. Fabian Flores-Jasso<sup>a</sup>, Victor Julian Valdes<sup>a</sup>, Alicia Sampieri<sup>a</sup>,  
Viviana Valadez-Graham<sup>b</sup>, Felix Recillas-Targa<sup>b</sup>, Luis Vaca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Genética Molecular, UNAM, Mexico, D.F. 04510, Mexico

### Abstract

We review several aspects of RNAi and gene silencing with baculovirus. We show that the potency of RNAi in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) insect cells correlates well with the efficiency of transfection of the siRNA. Using a fluorescein-labeled siRNA we found that the siRNA localized in areas surrounding the endoplasmic reticulum (ER). Both long (700 nucleotides long) and small (~25 nucleotides long) interfering RNAs were equally effective in initiating RNA interference (RNAi), and the duration of the interfering effect was indistinguishable. Even though RNAi in Sf21 cells is very effective, *in vitro* experiments show that these cells fragment the long dsRNA into siRNA poorly, when compared to HEK cells.

Finally, we show that *in vivo* inhibition of baculovirus infection with dsRNA homologous to genes that are essential for baculovirus infectivity depends strongly on the amount of dsRNA used in the assays. Five hundred nanogram of dsRNA directly injected into the haemolymph of insects prevent animal death to over 95%. In control experiments, over 96% of insects not injected with dsRNA or injected with an irrelevant dsRNA died within a week. These results demonstrate the efficiency of dsRNA for *in vivo* prevention of a viral infection by virus that is very cytotoxic and lytic in animals.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Systemic RNAi; Double stranded RNA; siRNA; Gene silencing; Baculovirus; Viral infection; *In vivo* inhibition

### 1. Introduction

Introduction of double stranded RNA (dsRNA) into a wide variety of cells and organisms results in depletion of the homologue endogenous messenger RNA (mRNA) (Caplen et al., 2000; Chuang and Meyerowitz, 2000; Fire et al., 1998; Romano and Macino, 1992; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000).

This phenomenon now known as RNA interference or RNAi in animals is related to the post transcriptional gene silencing (PTGS) phenomena first discovered in plants as co-suppression (Napoli et al., 1990; Tabara, 2001; Vaucheret et al., 2001).

RNAi is rapidly becoming a powerful tool for gene silencing (Voorhoeve and Agami, 2003). What only a few years ago was the dream of many cell biologists, namely to have a way to explore the function of several genes simultaneously,

is a reality today. With RNAi one can knockdown as many genes as one desires efficiently and selectively in cell cultures and even in living organisms. The most dramatic example was provided with the nematode *Caenorhabditis elegans*, where the term “genome-wide RNAi” has taken gene silencing technology to a new level (Maeda et al., 2001).

Even though the mechanism by which RNAi operates is not yet completely understood, many researchers are taking advantage of this phenomenon in different ways. The rapid production of knockdown animals where genes of interest have been selectively silenced is just one of many possible uses for RNAi (Voorhoeve and Agami, 2003).

Another obvious use for RNAi is the selective silencing of viral genes essential for virulence (Lawrence, 2002; Shuey et al., 2002). This objective is particularly important given the lack of good antiviral agents in the face of a large number of viral diseases afflicting humans. RNAi cannot only be used as a possible antiviral therapy, but also as a powerful tool to explore and better understand the basic aspects of viral entry into host cells, disassembly, replication, particle assembly and export out of the infected cell. This tool

\* Corresponding author. Tel.: +52-5-622-5654; fax: +52-5-622-5611.  
E-mail address: [lvaca@ifc.unam.mx](mailto:lvaca@ifc.unam.mx) (L. Vaca).