UNIVERSIDAD EL BOSQUE FACULTAD DE MEDICINA
AREA MEDICINA COMUNITARIA
FORMACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN

FICHA TÉCNICA PROYECTO DE GRADO					**ACTUALIZACIÓN**				
SEMESTRE					**Día**	**Mes**		**Año**	
VI	VII	VIII	IX	X	19	03		2019	
ASIGNATURA INVESTIGACIÓN EN SALUD:					Intro	I	II	III	IV

Cada uno de los estudiantes, deberá presentar y mantener actualizada la ficha técnica de su proyecto de investigación. Para ello se ha diseñado un modelo de ficha que facilite la presentación del proyecto y disponer de información actualizada sobre el mismo.

INFORMACIÓN GENERAL

TÍTULO DEL PROYECTO				
Sistema Ubiquitina-Proteosoma como blanco de acción antiviral.				
DATOS DE LOS ESTUDIANTES				
	Carné	**Programa**	**Teléfono**	**Dirección Electrónica**
	1020826730	Medicina	321 276 8651	jherreraro@unbosuqe.edu.co
	1018498879	Medicina	3102645204	nchaconh@unbosuqe.edu.co
	1061804147	Medicina	3128713986	jverhelst@unbosuque.edu.co
Está inscrito a un grupo de investigación		**SI**	NO	

UNIVERSIDAD EL BOSQUE FACULTAD DE MEDICINA
AREA MEDICINA COMUNITARIA
FORMACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN

Nombre del grupo de investigación	**Virología**
Nombre completo del director de la investigación / investigador principal / co-investigador y tutor.	**Eliana Patricia Calvo Tapiero**
Dirección electrónica	**calvoeliana@unbosque.edu.co**
DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	
1. Título del Proyecto de investigación	
Evaluación del efecto del Bortezomib sobre la replicación del virus chikungunya	

2. Planteamiento del problema

La ubiquitinación es una modificación post-traduccional típica de células eucariotas, que consiste en la unión covalente de una o varias moléculas de ubiquitina (Ub) a una proteína blanco (1). Aunque la señal de poli ubiquitinación es la marca para la degradación específica de proteínas vía proteosoma (P), también regula un amplio rango de procesos celulares como la progresión del ciclo celular, endocitosis, tráfico intracelular, reparación de DNA, transcripción, señalización, presentación de antígenos entre otras (2).

Durante una infección viral, los virus toman ventaja de la célula hospedera para llevar a cabo su ciclo de vida, mientras que la célula debe reconocer y reaccionar ante el agente invasor para contrarrestarlo y eliminarlo. En esta cascada de eventos de acción viral versus reacción celular, el sistema ubiquitina proteasoma (Ub-P) desempeña un papel importante. Las células utilizan el sistema para generar las respuestas inmune innata y adaptativa, mientras que algunos virus como el chikungunya pueden emplear este sistema a su favor de tal forma que se pueda completar su ciclo replicativo. Algunos otros virus buscan inducir la degradación de receptores, proteínas adaptadoras y de señalización, lo que les permite inactivar la producción de interferón y otras moléculas mediadoras de la respuesta inmune (3) (4). Esto les permite escapar del sistema inmune.

Debido a lo anterior, el presente trabajo pretende hacer una revisión corta de literatura actual sobre el sistema Ub-P, el chikungunya y los inhibidores del proteasoma para posteriormente realizar un trabajo experimental en el que se busca identificar si hay un rol del sistema Ub-P en la replicación viral del chikungunya y evidenciar como la inhibición del proteasoma podría ser un blanco de acción antiviral.

3. Pregunta problema

¿El bortezomib, inhibidor del proteosoma utilizado actualmente como fármaco anti cáncer, presenta acción antiviral contra el virus chikungunya?

4. Objetivo general

Establecer si la inhibición del proteasoma, afecta el ciclo replicativo del virus chikungunya.

5. Objetivos específicos

- Establecer si el Bortezomib ejerce un efecto citotóxico sobre la línea celular HEK293T

- Analizar el efecto de un inhibidor del proteasoma sobre la replicación viral.

6. Marco teórico:

El sistema ubiquitina proteosoma

La ubiquitinación es una modificación postraduccional típica de células eucariotas, que consiste en la marcación de una proteína blanco con ubiquitina (Ub), la cual es una proteína pequeña, conservada y ubicua **(1)**. El marcaje de una proteína consiste en enlace peptídico entre el grupo α-carboxilo terminal de la Ubiquitina y el grupo ε- amino de una lisina (K) presente en la proteína blanco. Esta modificación de la estructura de dicha proteína produce cambios en la estabilidad, localización y/o su actividad.

La presencia de siete residuos de lisina en la Ub (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) permite la formación de diferentes cadenas de poliubiquitina, el residuo de lisina utilizado en la formación de la cadena definirá la ruta o el destino de la proteína marcada; así las cadenas poliubiquitina con 4 o más residuos unidos por la lisina 48, son la señal que conduce a la degradación de la proteína vía proteasoma **(3)**.

El proceso anteriormente mencionado es de carácter secuencial, consiste en tres pasos que involucra asimismo tres enzimas. En primer lugar, la ubiquitina es activada por la enzima Activadora de Ubiquitina (E1) dependiente de ATP, posteriormente una enzima Conjugadora o (E2) transporta la ubiquitina hasta la proteína sustrato y finalmente, la unión al sustrato, es catalizada por la enzima Ligasa o E3 **(1,4).** Se habla también de un cuarto paso, dado que la ubiquitinación es reversible mediante la acción de proteínas deubiquitinadoras (DUB's). Estas últimas se encargan de remover la ubiquitina de las proteínas marcadas mediante la hidrólisis de sus resíduos **(7).**

La marcación de proteínas por ubiquitina es un proceso muy específico, esto es gracias a que el genoma humano codifica para una única enzima E1, cerca de 40 enzimas E2 y más de 400 E3 ligasas; este último grupo es el más grande, diverso, y el que le confiere especificidad al sistema. Comprende tres familias: RING, HECT y U-box, clasificadas de acuerdo a la estructura del dominio ligasa y a la forma como reconocen la proteína sustrato **(5)**.

La ubiquitinación regula un amplio espectro de procesos fundamentales para una célula eucariota como la progresión en el ciclo celular, endocitosis, tráfico intracelular, reparación de DNA, transcripción, señalización, presentación de antígenos; y degradación específica de proteínas vía proteasoma, entre otro **(2,4)**.

El proteasoma es un complejo proteasa dependiente de ATP formado por 33 proteínas divididas en dos subunidades: la partícula central o core 20S, y la partícula reguladora o subunidad 19s. La partícula reguladora, responsable del reconocimiento y despliegue de proteínas poliubiquitinadas, está compuesta por una base y una tapa. Su base se compone de ATPasas, receptores de ubiquitina y proteínas de andamiaje, mientras que la tapa se compone de proteínas no ATPasas (Rpns) y enzimas deubiquitinadoras **(6,7)**.

Además, el core tiene una estructura en forma de barril y allí se encuentran las subunidades catalíticas que hidrolizan la cadena de la proteína marcada en fragmentos cortos de polipéptidos para el proteasoma emplea diferentes dominios enzimáticos mediante los cuales lleva a cabo la hidrólisis, estos son B1, B2 y B5, que muestran actividad similar a caspasa, tripsina y quimiotripsina.

Para iniciar el proceso de degradación vía proteasoma, los sustratos marcados con la cadena de poliubiquitina-K48 son reconocidos por los receptores de ubiquitina localizadas en la tapa de la subunidad 19s, luego la señal de ubiquitina es removida por un proceso de ubiquitinación por una o más enzimas deubiquitinadoras (DUBs) propias del complejo ya que los DUBs afectan la función, localización o estabilidad de las proteínas, por último la proteína sustrato es desplegada y translocada hacia la partícula central. Allí la proteína en cuestión es degradada por las subunidades proteolíticas de la subunidad 20s **(7)**.

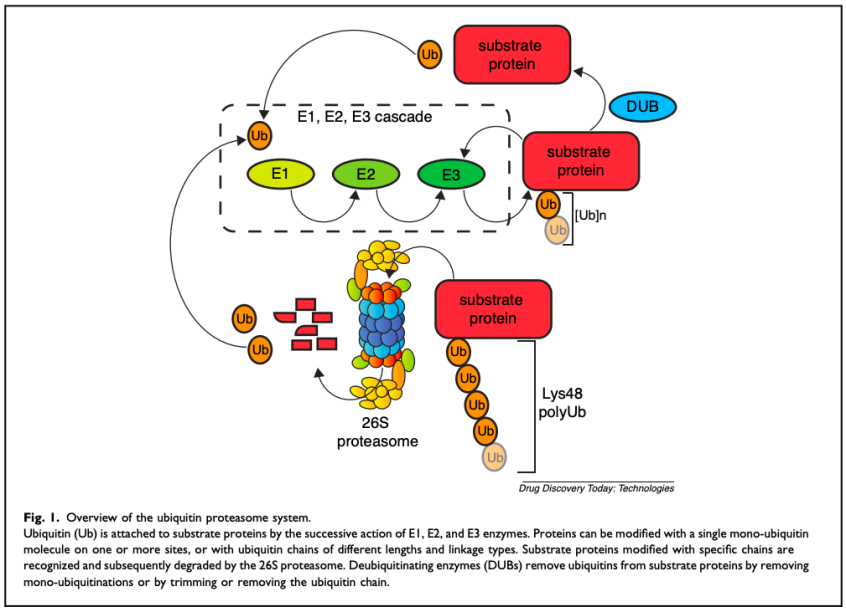


Fig. 1. Overview of the ubiquitin proteasome system.
Ubiquitin (Ub) is attached to substrate proteins by the successive action of E1, E2, and E3 enzymes. Proteins can be modified with a single mono-ubiquitin molecule on one or more sites, or with ubiquitin chains of different lengths and linkage types. Substrate proteins modified with specific chains are recognized and subsequently degraded by the 26S proteasome. Deubiquitinating enzymes (DUBs) remove ubiquitins from substrate proteins by removing mono-ubiquitinations or by trimming or removing the ubiquitin chain.

Figura 1. Sistema Ubiquitina proteasoma. Tomada de: Leestemaker Y, Ovaa H. Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. Drug Discov Today Technol [Internet]. 2017;26:25–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.11.006.

Inhibidores del proteosoma

Estos comprenden un grupo de moléculas que apuntan a impedir la función catalítica del proteasoma, es importante puntualizar que solo algunos se han utilizado en el ámbito clínico, mientras que la mayoría se emplean en investigación.

Ahora, antes de abordarlos individualmente, vale la pena mencionar que estos se agrupan según su grupo farmacóforo y según la generación a la que pertenezcan. En este orden de ideas, según su grupo se

pueden catalogar en boronatos, epoxicetonas y salinosporamidas; o pueden ser agrupados según si son de primera o segunda generación.

MG-132:
Es un inhibidor del proteasoma caracterizado por la presencia de un grupo aldehído como grupo farmacóforo. Este se caracteriza por la unión reversible al proteasoma en un residuo Thr-1, lo cual conduce al bloqueo de la función proteolítica tipo quimotripsina ubicada en la subunidad 20S, lo que genera un arresto del ciclo celular **(9,10)**.

Lactacistina:
Es un inhibidor del proteasoma natural descubierto en la década de los noventas. Es un metabolito producido por el Streptomyces el cual produce la inhibición del crecimiento celular. El mecanismo mediante el cual ejerce su función, se caracteriza por la unión a la subunidad 20s del proteasoma, de tal modo que inhibe las funciones hidrolíticas similares a caspasa, tripsina y quimotripsina, las dos primeras de forma irreversible.

Conviene subrayar que, la lactacistina se convierte en clasto-lactacistina-B-lactona, la cual es metabólicamente activa y es parte del proceso que culmina en la inactivación del proteasoma. Además, la lactacistina cumple una función inhibitoria exclusiva sobre proteasoma 26s en comparación con otros inhibidores los cuales ejercen acciones similares en proteínas como las calpaínas **(11,12)**.

Epoxomicina:
La epoxomicina es una epoxicetona aislada de Actinomyces. Esta, similar a la lactacistina, presenta un mecanismo de acción mediante la unión de su amino terminal a un residuo Thr1 de la subunidad 20s de forma irreversible. Sin embargo, a diferencia de la lactacistina, esta se concentra en impedir la función tipo quimotripsina. Esto da como resultado arresto del ciclo celular con una consecuente apoptosis y la activación del NF-kB **(13,14)**.

Carfilzomib:
Es un inhibidor del proteasoma de segunda generación, que también pertenece al grupo de las epoxicetonas, este medicamento actúa como citotóxico y proapoptótico, el cual impide la función enzimática tipo quimotripsina de manera selectiva **(15,16)**.

Bortezomib:
En 1980, se descubrió que el sistema ubiquitina proteosoma era el responsable de la proteolisis de varios tipos de proteínas entre estas las musculares, hasta el momento se creía que este sistema solo se relacionaba con proteínas mal plegadas y reguladoras **(17)**. A partir de este descubrimiento, se empezó a investigar sobre la degradación proteica vía sistema UP en varios cánceres, especialmente en el mieloma múltiple. La molécula que se utilizó para estos experimentos fue el bortezomib **(17)**.

El bortezomib es un inhibidor reversible de la actividad tipo quimotripsina. Este medicamento se ha asociado fuertemente con arresto del ciclo celular impactando en las concentraciones de ciclinas, la inducción de la apoptosis y la producción de interleucinas **(16,17)**.

Adicionalmente, el mecanismo de acción del bortezomib depende del estrés en el retículo endoplasmático rugoso, en el cual se produce la acumulación proteínas poliubiquitinadas en su interior, lo que resulta en la lisis celular **(18)**.

El virus del Chikunguya

El virus del chikungunya es un alfa virus perteneciente a la familia Togaviridae. Filogenéticamente existen 2 tipos de virus: el de África del oeste(W.A) y el de África central/sur/este (ESCA), son transmitidos por los mosquitos Aedes aegypti y Aedes albopictus (**32)**. Su infección se caracteriza por una fase aguda de fiebre, poliartralgias y rash maculopapular, un 50-60 % de los pacientes evolucionan a una fase de artritis crónica causando disfuncionalidad y afectando gravemente la calidad de vida.**(33)**

Su nombre deriva del idioma makonde que puede ser traducido como "aquel que se encorva" o "la enfermedad que dobla las articulaciones"(**33, 34).** Fue descubierto en 1952, en Makonde, meseta de Tanganyika al sur de Tanzania, aislado del suero de un paciente con manifestaciones clínicas de la enfermedad. **(33) (32)**

En Colombia los primeros casos se presentaron en el año del 2014 en el departamento de Bolívar, con un total de casos de 106592 en el mismo año. **(34)** En el año 2018 según el instituto nacional de salud se reportaron un total de 663 casos y para el Periodo epidemiológico II Colombia, 2019 se han reportado 104 casos. **(Informe evento Chikungunya, Colombia a periodo epidemiológico XIII de 2018)(Chikungunya Periodo epidemiológico II Colombia, 2019).** Desde el año 2000 se considera una enfermedad reemergente, que ha infectado a millones de personas alrededor del mundo convirtiéndolo en un problema de salud pública. **(33)**

En cuanto a, su material genético es RNA sentido positivo, con 11.805 nucleótidos, el cual se divide en dos secciones, una compuesta por 7424 nucleótidos de la cual se transcriben proteínas no-estructurales NSP-1. NSP-2, NSP-3, NSP-4, una región no-codificante de 76 nucleótidos y una región de 3732 nucleótidos que codifica para proteínas estructurales del virus, E-1, E-2, E-3, C y K6. **(32, 33).**

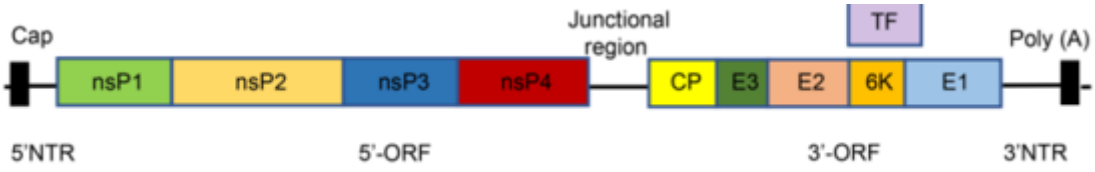


Figura 2. Material genético del virus chikungunya, tomado de: An W, Ge N, Cao Y, Sun J, Jin X. Recent progress on chikungunya virus research. Virol Sin. 2017;32(6):441–53.

Se cree que el virus entra a la célula por medio de un receptor de glicoproteína E2. Este se internaliza por medio de endocitosis, que puede ser de dos tipos: la vía mediada por clatrina o la vía independiente de clatrina y dependiente de Eps-15. **(33)**.

Tras la formación del endosoma, esté adoptará un pH ácido, esto conlleva a la disociación del heterodímero E1-E2, la disociación promueve un cambio conformacional de E1, lo que le permite la fusión de la membrana celular y la envoltura viral. En este momento se libera la nucleocápside del virus. Tras este paso, la nucleocápside se une a los ribosomas y entra en la fase de denudación, en donde el RNA viral es liberado. **(33).**

La primera proteína codificada es nsP-1234 la cual cuando es traducida se originan dos proteínas: nsP-123 y nsP-4 las cuales forman la replicasa viral. Seguido a esto se sintetiza el RNA de sentido negativo que sirve como molde para que mediante la maquinaria celular halla transcripción a RNA de sentido positivo **(33).**

Una vez formado el RNA sentido positivo, se puede generar la poliproteína pE2-6K-E1 y las proteínas de la cápside. Estas pasarán a modificaciones postraduccionales en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi para formar la nucleocápside. Por último la nucleocápside es transportada a la membrana plasmática para poder dar origen a un virus completo maduro. **(33).**

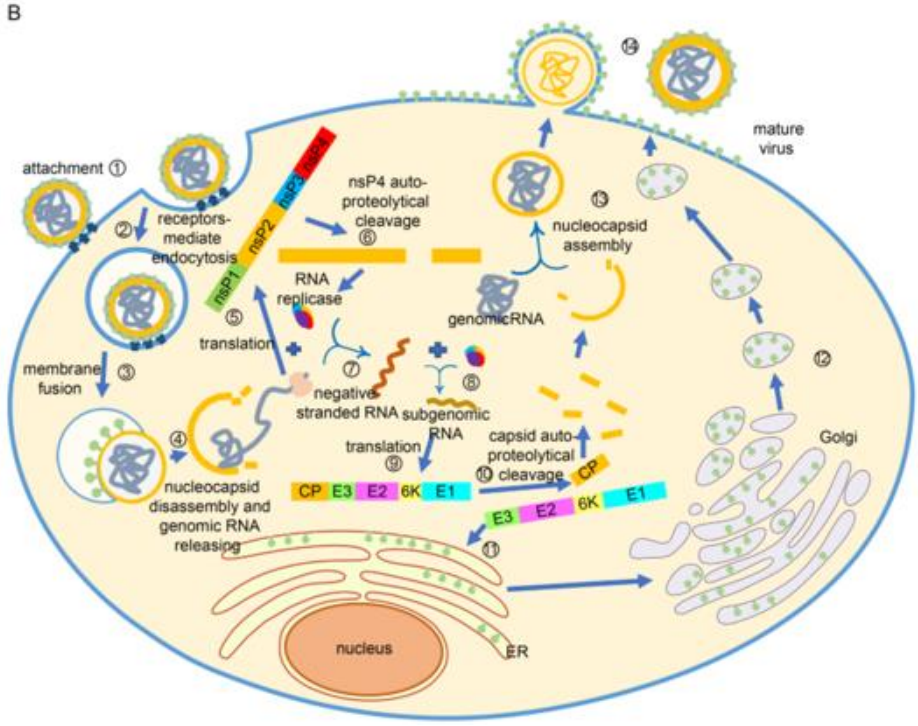


Figura 3. Ciclo de replicación viral Tomado de: An W, Ge N, Cao Y, Sun J, Jin X. Recent progress on chikungunya virus research. Virol Sin. 2017;32(6):441–53.

Virus y sistema Ubiquitina-Proteasoma

El típico ciclo de vida del virus se compone de entrada celular, denudación de la cápside y liberación del genoma viral, transcripción, replicación, expresión de proteínas, ensamblaje de partículas y evasión del sistema inmune. Este proceso requiere una gran cantidad de maquinaria celular incluida en sistema ubiquitina proteosoma. **(27).**

Entrada viral

La entrada de virus en la célula sigue una secuencia de eventos que incluyen la fijación de la partícula del virus a la superficie celular, señalización, internalización, transporte endocítico, fusión denudación de la cápside y liberación del genoma. **(28)**

Por ejemplo, el JEV depende de maquinaria del sistema UP activa ya que esta permite el transporte de moléculas necesaria para su replicación. **(29)** Por otro lado la proteína, CBLL1 actúa en conjunto con el sistema UP para regular la internalización del Virus del nilo del oeste, para una etapa de post internalización ya que la ruta del proteasoma es cooptada por varios flavivirus para promover la replicación viral. **(30)**

Así mismo, se ha encontrado que en la infección de células con inhibición del sistema UPS por medio del inhibidor del proteasoma MG132, se encontraban partículas virales en el endosoma y lisosoma, lo cual significa que este sistema está directamente relacionado con la liberación del virus del endosoma de entrada hacia el citosol **(31)**

Denudación del genoma viral

Otro paso importante en el ciclo de replicación viral es la denudación del genoma, en este se ha encontrado que el proteosoma tiene varias funciones en este paso del ciclo. **(27)** Un ejemplo es con el virus del dengue, el cual para poder degradar su cápside necesita del proteosoma de la célula **(Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination).**

Así mismo, el virus de la fiebre porcina africana mejoró la actividad del proteasoma y la acumulación de proteínas poliubiquitinadas que rodean las fábricas virales. Las proteínas asociadas al núcleo y involucradas en la replicación del ADN pueden ser dianas para la vía de la ubiquitina-proteasoma que posiblemente podría ayudar al virus que no se encuentra en la capa final y la liberación del ADN viral. En pasos posteriores, las proteínas poliubiquitinadas en fábricas virales podrían ejercer un papel regulador en la señalización celular. **(The ubiquitin-proteasome system is required for African swine fever replication)**

Replicación

El proceso de replicación del material genético viral es un paso crucial en el ciclo viral, es el que sigue después de la denudación del genoma. Muchos tipos de virus utilizan el sistema UP para poder replicar su genoma. Este es el caso de los flavivirus, en estudios utilizando inhibidores del proteosoma como lactacisitina y MG132 en células infectadas, se redujo significativamente la amplificación del RNA. **(Appraising the Roles of CBLL1 and the Ubiquitin/Proteasome System for Flavivirus Entry and Replication)**

El Sistema ubiquitina-proteasoma actúa en más de una fase del ciclo de replicación viral, entre ellos la expresión génica y la infección latente. Un ejemplo de esto es el virus de Epstein-Barr, el cual mediante la proteína EBNA1 activa la expresión de genes que controlan la persistencia de los genomas virales en células infectadas **(29)**, mientras que las proteínas LAMP2A y LMP1 regulan la replicación latente o lítica a través de la interacción con las E3 Ubiquitina-ligasas y proteínas deubiquitinadoras **(29)**.

Además, el astrovirus humano, virus de vaccinia, tumbusvirus, virus de la hepatitis E, circovirus porcino tipo 2 y virus de ébola son reguladas por el sistema ubiquitina proteosoma y estudios reciente revelan que el sistema UP es necesario para una replicación eficiente **(Pleiotropic roles of the ubiquitin-proteasome system during viral T propagatio)**.

Evasión del sistema inmune

La ubiquitinación juega un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes antivirales del huésped. La respuesta inmune innata del huésped es la primera línea de defensa contra los patógenos invasores, y existe una interacción compleja entre los virus y los anfitriones para limitar los múltiples pasos del ciclo de vida viral. Algunas proteínas celulares pueden funcionar como factores de restricción para limitar la infección viral al inhibir directamente la replicación viral o el ensamblaje viral. Por ejemplo, la polimerasa PB1 del virus de la influenza A (IAV) se ubica en K48 por la ubiquitina ligasa TR3 de E3 celular, y la degradación proteasomal resultante bloquea la replicación viral **(Pleiotropic roles of the ubiquitin-proteasome system during viral T propagation)**

Table 1
The different roles of UPS in viral propagation.

No.	Virus	Ubiquitinated protein	Ubiquitin acceptor sites/Ub-chain type	Roles of the ubiquitinated proteins in viral propagation	Refs
1	IAV	NP;	Lys184, Lys227, Lys273;	Facilitating viral replication;	[25–26];
		M2;	Lys78;	Enhancing IAV production;	[27];
		PB1	Lys48	cellular antiviral defence	[28]
2	DENV	NS1	Lys48	Regulation of NS1-NS4B interactions	[29]
3	CPXV	54 viral proteins	Lys(6, 11, 27, 29, 33, 48, 63)	Diverse roles in viral infection	[30]
4	ALV	Intergrase	Thr10, Cys37	Degradation signal	[31]
5	RSV	Gag	C-terminalglycine of Gag	Viral budding and release	[32]
6	HSV-1	Capsid	Lys48;	Viral genome release;	[36]
		IκBα	Lys48 (deubiquitination)	Immune evasion	[64]
7	Rotavirus	Unknown	Unknown	Enhancing viral replication	[38–39]
8	HTLV-1	Tax	Monoubiquitination	Transcriptional regulation	[40]
9	HIV-1	Tat	Lys(27, 29, 33)	Viral transcription;	[41]
		Gag	Unknown	Viral budding and release	[43]
10	HCV	NS2	Lys63	Viral envelopment	[42]
11	MCoV	Unknown	Unknown	Viral particle release	[44–45]
12	HAstV	Unknown	Unknown	Efficient replication	[47]
13	VACV	Unknown	Unknown	Viral replication	[48]
14	TBSV	P33	Lys70 and Lys76	Viral replication	[49]
15	HEV	Unknown	Unknown	Viral replication	[50–51]
16	PCV-2	Capsid	Unknown	Viral replication	[52]
17	EBOV	VP35	Lys309	Viral replication	[53]
18	PRRSV	NEMO	M1	Immune modulation	[66]
19	EBV	RIPK1/3	Lys63	Inhibition of host antiviral defences	[67]
20	HPV	E7	N-terminal residue of E7	Inhibitory growth of tumour	[70–71]

(Pleiotropic roles of the ubiquitin-proteasome system during viral T propagation)

7. Metodología

El proyecto se desarrollará bajo condiciones estrictas de bioseguridad, la manipulación del virus se realizará en un laboratorio de uso exclusivo para el trabajo con patógenos y sólo será manipulado por personal calificado; los estudiantes de pregrado en ningún caso tendrán contacto directo con partículas infecciosas.

Materiales:

• **Cepa viral:** Se utilizará la cepa CHIKV-G461. Este virus fue aislado a partir del suero de un paciente febril en el marco del proyecto “Establecimiento de un algoritmo de laboratorio para la confirmación de casos de dengue en individuos con síndrome febril atendidos en instituciones de salud de Cundinamarca”.

• **Línea celular:** HEK 293T, La línea celular 293T, originalmente denominada 293tsA1609neo, es un derivado altamente transfectable de las células del riñón embrionario humano 293, y contiene el antígeno T de SV40. Esta línea celular es competente para replicar vectores que llevan la región de replicación SV40. Da títulos altos cuando se usa para producir

retrovirus. Ha sido ampliamente utilizado para la producción retroviral, la expresión génica y la producciónn de proteínas.

• **Inhibidor del proteasoma**: Bortezomib

Métodos

1. **Para establecer si el Bortezomb tiene un efecto citotóxico sobre las células HEK293T:**

Se sembrarán las células en una placa de 96 pozos a una densidad de 25.000 células por pozo, al día siguiente se tratarán con DMSO (solvente) o concentraciones crecientes (0.5, 1 y 2,5 µM) de Bortezomib por 1h, 2h, 4h y 24h; finalizado este tiempo, se removerá el inhibidor y se colocará medio DMEM con suero fetal bovino al 2% y se regresarán a condiciones normales de cultivo por 24h.

Finalizado el experimento, se realizará un ensayo de viabilidad celular como MTT y/o rezasurina así:

Ensayo de Viabilidad Celular

Resazurina

1. Preparar la Resazurina a 44 mM en DMEM 1X
   Para 10mL: 1mL del stock de Resazurina (440mM) + 9 mL de DMEM
2. Retirar el medio y adicionar 100 µL de resazurina por pozo.
3. Incubar a 37°C en atmosfera de CO_2 al 5% hasta que vire a color rosado***** (3 horas aprox). ***Revisar la placa cada 30 minutos**.
4. Leer a longitud de onda de 535nm con filtro de 595 (fluorescencia)

MTT

1. Preparar el MTT a 0.5mg/mL en DMEM 1X
   Para 10mL: 1mL del stock de MTT (5mg/ml) + 9 mL de DMEM 1X
2. Retirar el medio y adicionar 100 µL de MTT por pozo

4. Incubar a 37°C en atmosfera de CO_2 al 5% hasta que se formen los cristales oscuros al interior de la célula. Observar la placa cada 30 minutos al microscopio.

5. Retirar el medio y adicionar 70 µL de DMSO por pozo

6. Incubar a 37°C en atmosfera de CO_2 al 5% por 10 minutos

6. Agitar suavemente por 5 min

7. Leer en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570, con filtro de 630.

2. Para establecer si el Bortezomib, afecta la replicación del virus chikungunya.

Sembrarán las células en una placa de 48 pozos a una densidad de 50.000 células por pozo, al día siguiente se tratarán con DMSO (solvente) o con el Bortezomib* por 1h , se retirará el inhibidor y el tutor a cargo infectará al MOI de 0.5 por 1h, el virus será retirado y las células se incubaran en condiciones normales de cultivo (DMEM con 2% de SFB+AB) por 24h. Se recolectarán los sobrenadantes para extracción de ARN viral y cuantificaciónn de partículas virales por RT-qPCR.

-Extracción de ARN viral a partir de sobrenadantes de cultivo celular

Lisis de la Muestra
•Mezclar 200 µl del sobrenadante de cultivo celular (medio de cultivo celular) con 200 µl de ddH2O.
•Transferir la muestra al tubo de extracción provisto. Cerrar la tapa y agitar en vórtex.
•Colocar el tubo de extracción en un baño de agua durante 15 minutos a 65 ° C y durante 10 minutos a 95 ° C,
Unión del ADN y ARN.
•Agregar 400 µl de solución de unión al tubo de extracción provisto y mezclar la muestra completamente pipeteando arriba y abajo o mediante vórtex.
•Transferir la muestra a la columna. Cerrar la tapa y centrifuga durante 2 minutos a 11.000 x g (11.000 rpm).
•Desechar el tubo receptor con filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo receptor.
Primer lavado
•Agregar 500 µl de tampón de lavado R1 a la columna y centrifugar a 11.000 x g (11.000 rpm) por 1 minuto.
•Desechar el tubo receptor con filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo receptor.
Segundo lavado
•Agregar 700 µl de tampón de lavado R2 a la columna y centrifugar a 11.000 x g (11.000 rpm) por 1 minuto.
•Desechar el tubo receptor con filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo receptor.
•Eliminar el etanol residual por centrifugación durante 4 minutos a la velocidad máxima.
•Desechar el tubo receptor de RTA con filtrado.

Elución del ADN / ARN.
•Colocar la columna en un tubo de elución de 1,5 ml. Añadir 60 µl del tampón de elución R (precalentado a 65 ° C) directamente sobre la superficie de la columna.
•Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 11.000 x g (11.000 rpm) durante 1 minuto.

- **Detección de virus en sobrenadantes por RT-PCR**
  Se utilizará el Sistema One-step RT-PCR de Invitrogen
  - Descongelar todos los reactivos y homogenizar
  - Preparar la mezcla de reacción así:

Componente	Concentración final	Volumen por tubo en µl
Buffer 2X	1X	10
CHIKV EF 10 µM	0.2 µM	0.4

CHIKV ER 10 μM	0.2 μM	0.4
Enzima SSIII/Taq		0.4
H2O		3.8
Volumen Final		15 μl

- Colocar 15 μl de mix en cada tubo.
- Adicionar 5 μl del RNA extraído y homogenizar bien
- Colocar en el termociclador en el siguiente programa de Amplificación
  50°C 15 min para la Transcripción Reversa
  95°C 3 min Denaturación
  95°C 30 seg / 55°C 30 seg / 72°C 30 seg, por 30 ciclos
  72°C 5 min
- Analizar los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

- Cuantificaciónn de partículas virales en sobrenadantes por RT-qPCR

Se debe construir una curva de calibración con una cosecha viral de título conocido= Número de Unidades formadoras de placa en un mililitro (UFP/ml)

- Preparar 5 diluciones seriadas de RNA, tomando como stock de partida el RNA extraído a partir de la cosecha viral así

RNA stock= 5.000.000 UFP/ml
Dil 1= 10μl del stock de RNA + 90μl de H2O DEPC Concentración: 500.000 UFP/ml
Dil 2= 10μl de la dilución 1 + 90μl de H2O DEPC Concentración:50.000 UFP/ml
Dil 3= 10μl de la dilución 2 + 90μl de H2O DEPC Concentración:5000 UFP/ml
Dil 4= 10μl de la dilución 2 + 90μl de H2O DEPC Concentración:500 UFP/ml
Dil 5= 10μl de la dilución 2 + 90μl de H2O DEPC Concentración:50 UFP/ml
**Hacer esto en un área diferente al mesón de PCR

- Descongelar todos los reactivos y homogenizar
- Preparar la mezcla de reacción teniendo en cuenta que: 10 tubos serán para la curva de calibración (5 puntos por duplicado), dos serán para los controles negativos= sin plantilla y cada muestra se ha de correr por duplicado.

componente	**concentración final**	**volumen por tubo (μl)**	**volumen por tubos**
Buffer RT-qPCR 2X	*1X*	*7.5*	
E1 F1 10mM *E1R1 10mM*	*0.2 mM* *0.2 mM*	*0.3* *0.3*	
EnzimaSSIII/Taq		*0.3*	
H20		*1.3*	
V. Final		***10μ l***	

Se utilizará el kit LUNA UNIVERSAL RT-qPCR ONE STEP (New England)

- Colocar 10 µL de mix en cada tubo.
- Adicionar 5 µL de H20 en los controles negativos; 5 µL de RNA de cada muestra y por último 5µL de RNA de cada dilución. Homogenizar bien, dar un spin.
- Colocar en el termociclador CFX96 BIORAD en el siguiente programa amplificación.
  50°C 15 min Transcripción Reversa
  95°C 3 min
  40 CICLOS DE AMPLIFICACIÓN
  95°C 15 seg / 60°C 45 seg ** Detección
  Curva de Melting
  65°C-95°C /0.5 seg
- Editar la placa, definiendo la concentración de los estándares.
- Analizar los resultados

8. Resultados esperados para este semestre

No aplica

9. Cronograma

- Agosto 12 /2018: Búsqueda bibliográfica sobre "actividad del proteasoma en relación a la entrada viral

- Septiembre 1/2018: Se revisan temas:

Relación del proteasoma con la entrada viral en el HSV

Relación del sistema Ubiquitina proteasoma con el virus JVC

Inhibidores del proteasoma en infección por VIH

- Septiembre 5/2018: se envía el marco teórico de trabajo hasta el momento a los docentes de investigación.

- Octubre 22/2018: Revisión de artículo: Activities of proteasome and m-calpain are essential for Chikungunya virus replication.

- Octubre 29/2018: Planeación y organización del marco teórico, los objetivos y la metodología del trabajo de grado.

- Noviembre 02/2018: se envía el marco teórico, los objetivos y la metodología de trabajo hasta el momento a la tutora encargada.

- Noviembre 05/2018: se envía correcciones del marco teórico, los objetivos y la metodología de trabajo hasta el momento a la tutora encargada.
- Noviembre 27/2018: Terminar la propuesta de investigación

- Diciembre 3 al 11: Recibir el entrenamiento en las técnicas de Biología Molecular
- Diciembre 11 – Enero 30: Revisión de bibliografía nueva.
- Enero 30 – Febrero 12: Revisión de bibliografía y tabla de hallazgos en la literatura.

10 Referencias

1. Hershko A, Ciechanover A. THE UBIQUITIN SYSTEM. Annual Review of Biochemistry 1998 Jul;67(1):425-479.
2. Mayer RJ, Welchman RL, Gordon C. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005 Aug;6(8):599-609.
3. Dötsch V, Dikic I. Ubiquitin linkages make a difference. Nature Structural & Molecular Biology 2009 Dec;16(12):1209-1210.
4. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. Journal of cell science. 2012;125(Pt 3):531-7.
5. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. Nature Reviews Cancer 2006 May;6(5):369-381.
6. Michael H. Glickman, Aaron Ciechanover. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. Physiological Reviews 2002 Apr 1,;82(2):373-428.
7. Grice G, Nathan J. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. Cell Mol Life Sci 2016 Sep;73(18):3497-3506.
8. Nagyova E. The Biological Role of Hyaluronan-Rich Oocyte-Cumulus Extracellular Matrix in Female Reproduction. International journal of molecular sciences 2018 Jan 18,;19(1):283.

9. Guo N, Peng Z, Zhang J. Proteasome Inhibitor MG132 Enhances Sensitivity to Cisplatin on Ovarian Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. International Journal of Gynecological Cancer 2016 Jun;26(5):839-844.

10. Fenteany G, Schreiber SL. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. The Journal of biological chemistry 1998 Apr 10,;273(15):8545-8548.

11. Wang K, Yuen P. Calpains: Pharmacology and toxicology of a cellular protease.: CRC Press; 1999.

12. Lihao Meng, Royce Mohan, Benjamin H. B. Kwok, Mikael Elofsson, Ny Sin, Craig M. Crews. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999 Aug 31,;96(18):10403-10408.

13.Verbrugge S, Scheper R, Lems W, de Gruijl T, Jansen G. Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. Arthritis Research & Therapy 2015;17(1):17.

14. Bo Hu, Yu Chen, Saad Z Usmani, Shiqiao Ye, Wei Qiang, Xenofon Papanikolaou, et al. Characterization of the Molecular Mechanism of the Bone-Anabolic Activity of Carfilzomib in Multiple Myeloma. PLoS One 2013 Sep 1,;8(9):e74191.

15. Dra. Agneris López Sacerio, Dra. Dumeivy García Sánchez. Inhibidores del proteosoma: estrategia terapéutica en el síndrome linfoproliferativo crónico.

16. Goldberg AL. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. The Journal of cell biology 2012 Nov 12,;199(4):583-588.

17. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. Current cancer drug targets 2011 Mar;11(3):239.

18. Calvo EP, Coronel-Ruiz C, Velazco S, Velandia-Romero M, Castellanos JE. Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos. Biomédica 2016 Aug 1,;36(suppl 2):35-43.

19. Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjikar RS, Walimbe AM, Jadhav SM, et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. Journal of General Virology 2007 Jul 1,;88(7):1967-1976.

20. Khan AH, Morita K, Parquet MdC, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. Journal of General Virology 2002 Dec 1,;83(12):3075-3084.

21. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. The Journal of general virology 2015 Sep;96(9):2483-2500.

22. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on REunion. Epidemiology and Infection 2009 Apr 1,;137(4):534-541.

23. I-Ching Sam, Shih-Keng Loong, Jasmine Chandramathi Michael, Chong-Long Chua, Wan Yusoff Wan Sulaiman, Indra Vythilingam, et al. Genotypic and Phenotypic Characterization of Chikungunya Virus of Different Genotypes from Malaysia. PLoS One 2012 Nov 1,;7(11):e50476.

24. Joy Gardner, Itaru Anraku, Thuy T. Le, Thibaut Larcher, Lee Major, Pierre Roques, et al. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. Journal of Virology 2010 Aug 15,;84(16):8021-8032.

25. Thérèse Couderc, Fabrice Chrétien, Clémentine Schilte, Olivier Disson, Madly Brigitte, Florence Guivel-Benhassine, et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. PLoS Pathogens 2008 Feb 1,;4(2).

26. Calistri A, Munegato D, Carli I, Parolin C, Palu G. The Ubiquitin-Conjugating System: Multiple Roles in Viral Replication and Infection. Cells 2014 Jan 1,;3(2):386-417.

27. Khor R, McElroy LJ, Whittaker GR. The Ubiquitin-Vacuolar Protein Sorting System is Selectively Required During Entry of Influenza Virus into Host Cells. Traffic 2003 Dec;4(12):857-868.

28. Wang, Shaobo|Liu, Haibin|Zu, Xiangyang|Liu, Yang|Chen, Liman|Zhu, Xueqin|Zhang, Leike|Zhou, Zheng|Xiao, Gengfu|Wang, Wei. The ubiquitin-proteasome system is essential for the productive entry of Japanese encephalitis virus. Virology 2016;498:116-127.

29. Ronald N. Harty, Melissa E. Brown, Guangli Wang, Jon Huibregtse, Felicia P. Hayes. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: Implications for filovirus budding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000 Dec 5,;97(25):13871-13876.

30. Ulrich Schubert, David E. Ott, Elena N. Chertova, Reinhold Welker, Uwe Tessmer, Michael F. Princiotta, et al. Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000 Nov 21,;97(24):13057-13062.

31. Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. Annual Review of Biochemistry 2009 Jul 7,;78(1):477-513.

Revisada y aprobada por el director de la investigación (se firma para constancia).

La nota para este corte es de: 3.8

Eliana Calvo T
Docente

Evaluación del Efecto del Bortezomib sobre el Ciclo Replicativo del Virus Chikungunya.

Chacón, Natalia; Herrera, Jaime; Verhelst, Manuel; López, Lady; Calvo, Eliana;
Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.
Instituto de virología
Universidad El Bosque

INTRODUCCIÓN

El sistema ubiquitina-proteasoma (Ub-P) es responsable de la degradación específica de proteínas, mecanismo por el cual se regulan importantes procesos celulares como la proliferación, progresión del ciclo, diferenciación, transducción de señales y apoptosis, entre otros. Debido a que ha sido ampliamente descrito que la proteólisis dependiente del sistema Ub-P es fundamental para la replicación de los principales virus patogénicos humanos, y que el Bortezomib es un inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA para el tratamiento de mieloma múltiple, este trabajo evaluó su efecto sobre la replicación del virus chikungunya (CHIKV) en células HEK293T.

METODOLOGÍA

ENSAYOS DE INFECCIÓN

- **Cultivo Celular** HEK293
- **Infección** Tiempo: 4, 8, 12, 24 h
  - **CÉLULAS**
    - **Inmunofluorescencia**
      - Fijación (Metanol:Acetona)
      - Bloqueo (PBS 1X + SC 5%)
      - Ab 1° α-CHIKV E1 1:50
      - Ab 2°α-Mouse FITC 1:500
      - Hoechst 1:5000
  - **SOBRENADANTES**
    - **RT-qPCR**
      - Extracción de RNA viral
      - RT-qPCR Luna Universal
      - CFX96 Touch™ Real-Time PCR BIORAD

ENSAYOS DE INHIBICIÓN

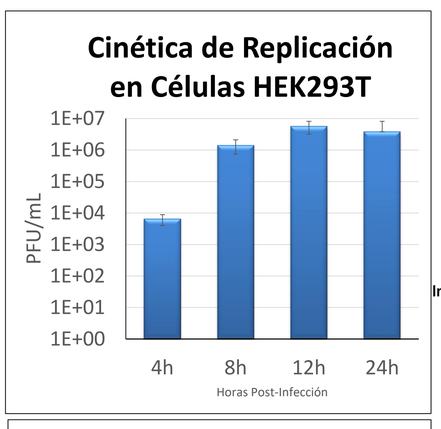
- **Cultivo Celular** HEK293
- **Tratamiento** Bortezomib (B) Concentración: 10-500 nM / 24h
  - **Viabilidad Celular** Resazurina
  - **Ensayo de Actividad**
    - Preparación de Lisado celular (RIPA)
    - Buffer de reacción (90 µL) + Extracto (10 µL)
    - Homogenizar e incubar a 37°C /30´
    - Detección a: 460nm / 360nm

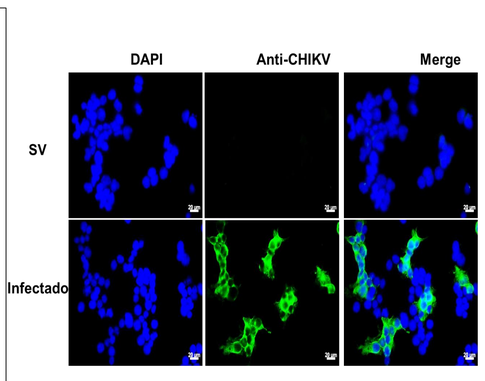
ENSAYOS DE INHIBICIÓN-INFECCIÓN

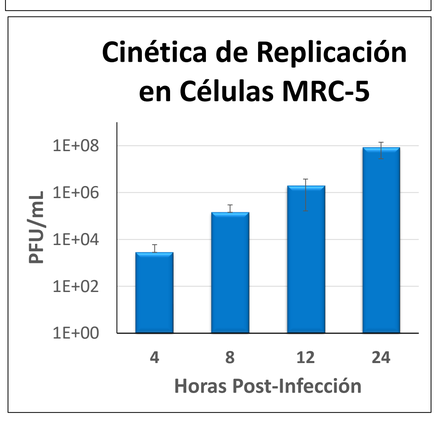
- **Cultivo Celular** HEK293
- **Tratamiento** Inhibidor a 1,0 y 2,5µM Tiempo de Exposición: 1h
- **Infección con CHIKV** MOI: 1,0 Tiempo: 1h
  - **CÉLULAS**
    - **Viabilidad**
  - **SOBRENADANTES**
    - **RT-qPCR**

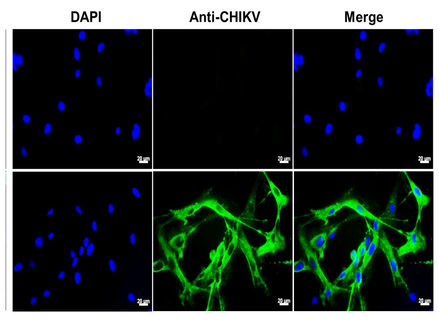
RESULTADOS

ENSAYOS DE INFECCIÓN

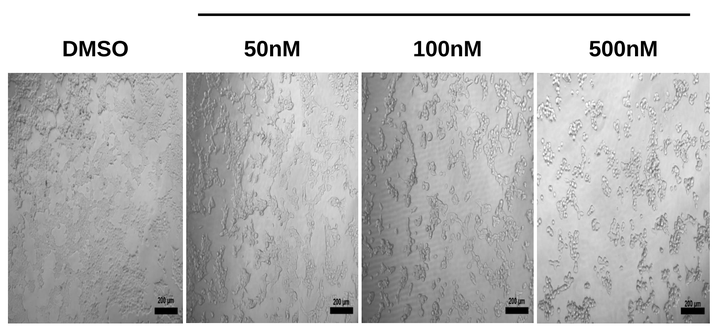


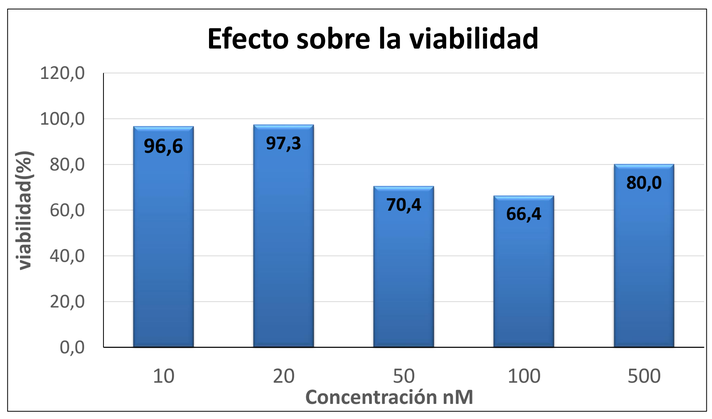




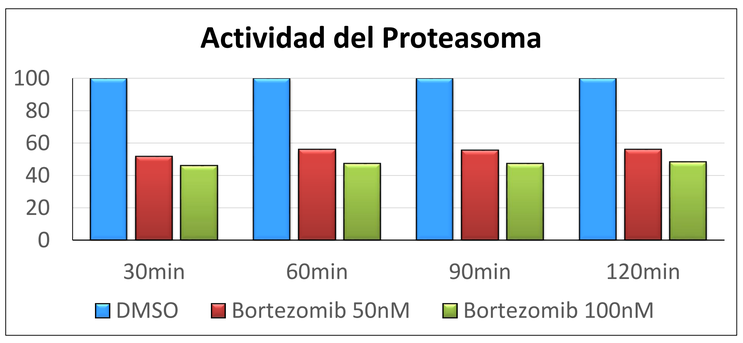


ENSAYOS DE INHIBICIÓN

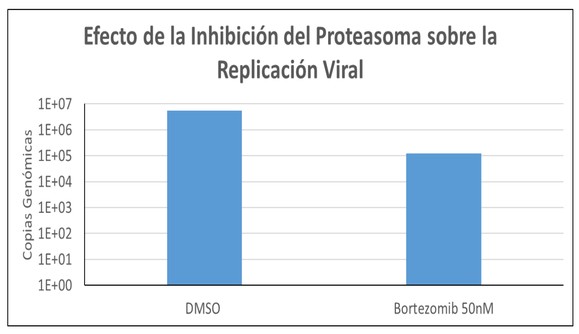




ENSAYOS DE ACTIVIDAD



INHIBICIÓN-INFECCIÓN



En células HEK es posible detectar partículas virales en el sobrenadante desde las 4 hpi, se alcanza un máximo de 10^6PFU/mL a las 12hpi con una ligera disminución a las 24hpi. En células MRC-5 el número de partículas aumentan de forma gradual hasta las 24hpi en donde alcanza un título viral de 10^8PFU/mL. A las 24hpi también fue posible detectar antígeno viral por inmunofluorescencia , lo que confirma la infección.

El bortezomib puede ejercer un fuerte efecto citotóxico sobre las líneas celulares humanas, por lo cual fue necesario evaluar diferentes concentraciones y determinar la concentración óptima para evitar la pérdida de la viabilidad celular. En células HEK el inhibidor puede utilizarse entre 10 y 50 nM por 24h

En células HEK la presencia del bortezomib durante la infección causó una disminución en el número de partículas virales liberadas al sobrenadante; se observó una disminución en cerca de 2 unidades logarítmicas en el número de copias genómicas.

CONCLUSIÓN

El Bortezomib podría ejercer un efecto antiviral sobre el virus chikungunya, aunque es necesario comprobar este efecto utilizando otras líneas celulares humanas.

FINANCIACIÓN COLCIENCIAS Convocatoria No. 745-2016 Contrato:296-2016

ASOCIACIÓN COLOMBIANA
DE VIROLOGÍA

UNIVERSIDAD
EL BOSQUE
Vigilada Mineducación

Instituto de Virología
Universidad El Bosque

VIII Simposio Colombiano de Virología y IV Congreso Latinoamericano de Virología

La División de Educación Continuada de la Universidad El Bosque

OTORGAN EL PRESENTE CERTIFICADO A

Natalia Chacón, Andrés Herrera, Jose Manuel Verhelst

Quienes participaron como ponentes del trabajo titulado:

Evaluación de la actividad antiviral del Bortezomib contra el Virus Chikungunya

Bogotá D.C., 03 al 05 de octubre de 2019

PhD. Myriam Lucia Velandia R
Coordinadora General del Evento
Universidad El Bosque

PhD. Julián Ruiz Sáenz
Presidente
Asociación Colombiana de Virología

LA DIRECCIÓN DEL ÁREA DE MEDICINA COMUNITARIA Y SU DEPENDENCIA DE FORMACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN FACULTAD DE MEDICINA

HACEN CONSTAR QUE:

El trabajo de grado Titulado **Evaluación del potencial antiviral del bortezombi contra el virus chikungunya,** fue dirigido por la Doctora Eliana Patricia Calvo Tapiero identificada con cédula de ciudadanía No. 52.178.336 de Bogotá D.C. Dicho trabajo tiene las siguientes características:

1. **Nombre de los Estudiantes**:
   Natalia Chacón Hernández — Cedula de Ciudadanía No. 1018498879
   Jaime Andrés Herrera Rozo — Cedula de Ciudadanía No. 1020826730
   José Manuel Verhelst — Cedula de Ciudadanía No. 1061804147
2. Fecha de Aprobación: 21 de julio de 2020
3. Fecha de Socialización: Homologación (participación en congreso)
4. Calificación del Trabajo de Grado: Meritorio

La presente se expide a solicitud de la interesado a los ventiuno (21) días del mes de octubre (10) de 2020

CLARA TARAZONA BERNAL
direccioncomunitaria@unbosque.edu.co
Directora Área de Medicina Comunitaria
Facultad de Medicina

IRENE PARRA GARCIA
invmedicina@unbosque.edu.co
Coordinadora Formación para la Investigación
Facultad de Medicina