

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIVIRALES E
INMUNOMODULADORAS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE LA
PROTEÍNA *SIGNAL-REGULATORY PROTEIN ALPHA* (SIRPA)**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología

María Paz García – 231811

Tutor: Dr. Nicolás Sarute

2024

Declaración de autoría

Yo, María Paz García, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el trabajo de grado;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



María Paz García

12/08/24

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a mi tutor Nicolás por permitirme formar parte de este proyecto y su laboratorio. Gracias por toda la paciencia, dedicación, confianza, orientación y enseñanzas durante este proceso.

Le agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Interacción Virus Célula: Naty, Kathy, Cami y Mati, por su disposición en todo momento para ayudarme y enseñarme, por la compañía durante este año, por las risas y buena onda en los momentos buenos y los no tan buenos.

Gracias a mi familia. Mamá, Papá y Faustino, por el sacrificio y apoyo incondicional durante este proceso. Gracias por siempre creer en mi capacidad, motivarme y bancar mis frustraciones y malhumores. Los quiero mucho.

Gracias a mis amigas, las que están lejos y las que están cerca, por siempre creer en mí, por su aliento y compañía y por sobre todo las risas en todo este tiempo. Las amo.

Por último, gracias a mis compañeros de carrera. Hicieron de este un proceso hermoso, divertido y disfrutable. Gracias por su apoyo, compañerismo y motivación.

Resumen

La glicoproteína SIRPA es un receptor transmembrana comprendido por un ectodominio con tres dominios del tipo Ig, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con dos motivos ITIM (inmunoreceptores inhibitorios basados en tirosina) que contienen 2 residuos de tirosina cada uno. La fosforilación de tirosina de ambos ITIMs media el reclutamiento y la activación de las fosfatasa de tirosina SHP-1 y SHP-2, que defosforilan distintos sustratos ejerciendo un efecto inhibitorio en vías de señalización intracelulares. La función mejor caracterizada de SIRPA es su rol inhibitorio en la fagocitosis mediada por actina filamentosa. Nuestro grupo demostró que, similar a su rol en la fagocitosis, SIRPA restringe la internalización de virus envueltos que explotan vías endocíticas para ingresar a las células. Además, la actividad de SIRPA también se asocia a la regulación de las vías de señalización MAPK y NF- κ B, inhibiendo la respuesta inflamatoria de macrófagos y granulocitos.

En este trabajo analizamos la actividad antiviral de SIRPA frente a virus de importancia para la salud pública pertenecientes a las familias *Flaviviridae* y *Arenaviridae* y su posible rol en la señalización inmune frente a estas infecciones. Con este fin, examinamos niveles de infección y la respuesta inmune innata en la línea celular humana A549 y en macrófagos primarios de ratón utilizando a los virus Zika y Dengue y el virus Junín como modelos de flavivirus y arenavirus, respectivamente, y moléculas agonistas sintéticas de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en células SIRPA *knockdown*. Mediante esta estrategia, establecimos que SIRPA es un factor antiviral contra los flavivirus ZIKV, DENV y JUNV-C1, pero su contribución a la regulación de la respuesta innata difiere según la vía de señalización inmune activada.

Debido a la actividad preponderante de SIRPA en el contexto de infección viral, también diseñamos y sintetizamos péptidos miméticos representativos de su dominio citoplasmático, para evaluar su potencial antiviral e inmunomodulatorio. Esta es una estrategia terapéutica con gran potencial, debido al fácil diseño y síntesis de los péptidos, bajos costos de producción y especificidad de acción. En este trabajo, evaluamos un péptido representativo del ITIM-1 de SIRPA, demostrando que aquellas células tratadas con este péptido mostraron niveles de infección viral menores que células control, aunque su actividad no reguló la señalización inmune aquí evaluada durante la infección. Este trabajo aporta información novedosa acerca de la biología de SIRPA en el contexto de infección viral, así como su potencial utilidad en el desarrollo de biofármacos antivirales.

Palabras clave: SIRPA; factor antiviral; señalización inmune; péptidos sintéticos.

Índice

Abreviaturas	7
1. Introducción	9
1.1. Respuesta inmune innata y receptores de reconocimiento de patrones	9
1.2. Flavivirus	13
1.3. Arenavirus	16
1.4. Regulación negativa de la señalización inmune	17
1.5. Signal-regulatory protein alpha (SIRPA)	18
1.6. Péptidos sintéticos.....	19
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo general	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Materiales y métodos	22
3.1. Cultivo celular	22
3.2. Generación de macrófagos derivados de medula ósea (BMDMs)	22
3.3. Extracción de ARN y retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)	22
3.4. Análisis de la expresión de SIRPA mediante western blot	25
3.5. Estimulaciones con moléculas agonistas de TLRs y RLRs	26
3.6. Infecciones virales.....	26
3.7. Silenciamiento de SIRPA mediante ARN de interferencia corto.....	26
3.8. Síntesis de péptidos sintéticos derivados de SIRPA	26
3.9. Microscopia de epifluorescencia	27
3.10. Análisis de la actividad antiviral e inmunomoduladora de los péptidos derivados de SIRPA	27
4. Resultados y discusión.....	28
4.1. Estimulación de TLRs y RLRs en células A549.....	28
4.2. Caracterización de la respuesta inmune en células A549 frente a infección con flavivirus.....	31
4.3. Estimulación de TLRs y RLRs en macrófagos primarios murinos.....	32
4.4. Infectividad y perfil inflamatorio de BMDMs infectados con arenavirus	34
4.5. Silenciamiento de SIRPA mediante ARN de interferencia.....	35
4.6. SIRPA restringe la entrada de flavivirus a células humanas	35
4.7. Rol de SIRPA en la producción de factores proinflamatorios e IFN-I tras la estimulación de RLRs en células A549.....	36
4.8. Rol de SIRPA en la producción de factores proinflamatorios e IFN-I tras la infección con ZIKV en células A549	37
4.9. Rol de SIRPA en la producción de factores proinflamatorios e IFN-I tras la estimulación con agonistas de TLRs y RLRs en células murinas primarias.....	38
4.10. Péptidos sintéticos derivados de SIRPA: localización subcelular y citotoxicidad ...	40

4.11.	Tratamiento con péptido ITIM-1 y su efecto en la señalización a través de los RLRs	41
4.12.	Tratamiento con péptido ITIM-1 y su efecto en la restricción viral y señalización inmune frente a la infección con ZIKV	42
4.13.	Determinación de expresión de SIRPA en macrófagos murinos primarios	43
4.14.	Tratamiento con péptido ITIM-1 WT reduce los niveles de infección con JUNV-C1 en macrófagos primarios murinos	44
5.	Conclusiones	45
	Referencias bibliográficas	46
	Anexos.....	53

Abreviaturas

MHC	complejo mayor de histocompatibilidad;
PRRs	receptores de reconocimiento de patrones;
IFN-I	interferones del tipo I;
AP-1	proteína activadora 1;
IRF	factor regulador del interferón;
NF- κ B	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas;
IFNAR	receptor de interferón α/β ;
ISGs	genes estimulados por interferón;
TLRs	receptores tipo Toll;
NLRs	receptores tipo NOD;
RLRs	receptores tipo RIG-I;
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos;
DAMPs	patrones moleculares asociados al daño;
ARNdh	ARN doble hebra;
ARNsh	ARN simple hebra;
MyD88	proteína de la respuesta de diferenciación mieloide 88;
TRIF	proteína adaptadora con dominio TIR inductora de interferón beta;
TRAM	proteína adaptadora asociada a TRIF;
IRF-3	factor regulador del interferón 3;
TNF- α	factor de necrosis tumoral α ;
IL	interleucina;
RIG-I	gen inducible por ácido retinoico I;
MDA5	proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5;
LGP2	proteína laboratorio de genética y fisiología 2;
MAVS	proteína mitocondrial de señalización antiviral;
DC-SIGN	molécula de adhesión intracelular no integrina específica de células dendríticas;

DENV	virus Dengue;
ZIKV	virus Zika;
OWA	arenavirus del Viejo Mundo;
NWA	arenavirus del Nuevo Mundo;
LCMV	virus de la coriomeningitis linfocítica;
JUNV	virus Junín;
TCRV	virus Tacaribe;
GP	glicoproteína;
SIRPA	proteína reguladora de señales alfa;
ITIMs	inmunoreceptores inhibitorios basados en tirosina;
SHP	fosfatasas de tirosina con dominios de homología Src-2;
VSV	virus de la estomatitis vesicular;
BMDM	macrófagos derivados de médula ósea;
KO	<i>knockout</i> ;
WT	<i>wild-type</i> ;
FITC	isotiocianato de fluoresceína;
ANOVA	análisis de varianza;
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol;
PBS	buffer fosfato salino;
x g	fuerza centrífuga relativa;
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>

1. Introducción

1.1. Respuesta inmune innata y receptores de reconocimiento de patrones

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del organismo frente a patógenos. Los macrófagos típicamente son las primeras células del sistema inmune que detectan microorganismos o células tumorales. Estos derivan de precursores monocíticos que circulan en la sangre y migran hacia los tejidos, para luego diferenciarse a macrófagos residentes de tejidos. Los macrófagos tienen roles funcionalmente distintos gracias a su capacidad de polarizarse hacia múltiples fenotipos de respuesta, a partir de la interacción con su microambiente y el reconocimiento de señales (1). Los monocitos circulantes y los macrófagos residentes pueden eliminar células infectadas directamente mediante fagocitosis; además, los macrófagos son los principales productores de mediadores inflamatorios durante la respuesta innata. Los factores relacionados a la inflamación incluyen la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y co-estimuladoras (2).

Los patógenos invasores son reconocidos mediante una serie de receptores denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). La identificación de estos PRRs y la caracterización de sus vías de señalización aguas abajo han expandido la comprensión de la activación del sistema inmune y la respuesta a infecciones virales (2). Los interferones del tipo I (IFN-I) fueron identificados en 1957 como efectores de la respuesta inmune innata, debido a su rápida inducción y producción frente a infecciones virales (2). En el transcurso de una infección viral, la expresión de IFN-I es inducida en diferentes tipos celulares debido a la activación de PRRs (3). La transcripción de los genes de IFN-I (IFN- α e IFN- β) es regulada positivamente por factores de transcripción de las familias AP-1, IRF y NF- κ B, contribuyendo aditivamente a la producción de estas moléculas (4). Luego de ser secretados, los IFN-I se unen al receptor de interferón α/β (IFNAR) en la superficie celular de manera paracrina y autocrina, activando su señalización y la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs) (2,3). Las proteínas codificadas por estos ISGs presentan una variedad de efectos antivirales directos e indirectos, resultando en el establecimiento de un estado antiviral (4,5). La actividad de los ISGs está dirigida a distintas etapas del ciclo de replicación viral, pudiendo bloquear la entrada de virus a células hospederas (proteínas IFITM), ingreso de ácidos nucleicos virales al núcleo (proteínas Mx), y síntesis de proteínas virales (proteínas IFIT) (6,7).

Los PRRs incluyen a los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs), receptores tipo RIG-I (RLRs) y sensores citosólicos de ADN. Estos receptores reconocen diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como también señales endógenas de peligro llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (8). Los TLRs constituyen una familia de proteínas transmembrana del tipo 1 y se expresan en células inmunes innatas (macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* y neutrófilos), así como en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos (9,10). Cada TLR reconoce un PAMP específico y los 10 TLRs

humanos se pueden categorizar funcionalmente en dos grupos en base a su localización subcelular y el tipo de patrón que reconocen. Los TLRs asociados a la membrana plasmática (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10) reconocen diversas moléculas en la superficie de patógenos principalmente bacterianos, mientras que los TLRs endosomales (TLR3, 7, 8, 9) reconocen ácidos nucleicos de patógenos internalizados (11,12). Específicamente, el heterodímero TLR1/2 reconoce triacil lipopéptidos, TLR2 es activado por lipoproteínas y peptidoglicanos bacterianos, TLR3 reconoce ARN doble hebra (ARNdh), TLR4 reconoce lipopolisacáridos, TLR5 reconoce flagelina, el dímero TLR2/6 es activado por diacillipopéptidos, TLR7/8 reconocen ARN simple hebra (ARNsh), mientras que el ADN CpG no metilado activa a TLR9 (13) (Figura 1).

Frente a la unión con su ligando, los TLRs desencadenan cascadas de señalización que culminan en la expresión de factores proinflamatorios e interferones, estableciendo la respuesta inflamatoria (10). El reconocimiento a través de estos receptores resulta en la dimerización y reclutamiento de la proteína adaptadora de la respuesta de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la proteína adaptadora con dominio TIR inductora de interferón beta (TRIF), y/o la proteína adaptadora asociada a TRIF (TRAM). La señalización dependiente de MyD88, utilizada por todos los TLRs excepto TLR3, culmina con la traslocación nuclear y activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NF- κ B) y la proteína adaptadora 1 (AP-1), mientras que las vías dependientes de TRIF, utilizadas por TLR3 y TLR4, culminan con la activación de NF- κ B y el factor regulador del interferón 3 (IRF-3) (Figura 1). De esta manera, la respuesta inmune que se establece es dependiente del PAMP detectado, ya que la activación temprana de NF- κ B desencadena la producción de citoquinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, mientras que la activación de IRF-3 se asocia a la producción de IFN- β e ISGs (8,13).

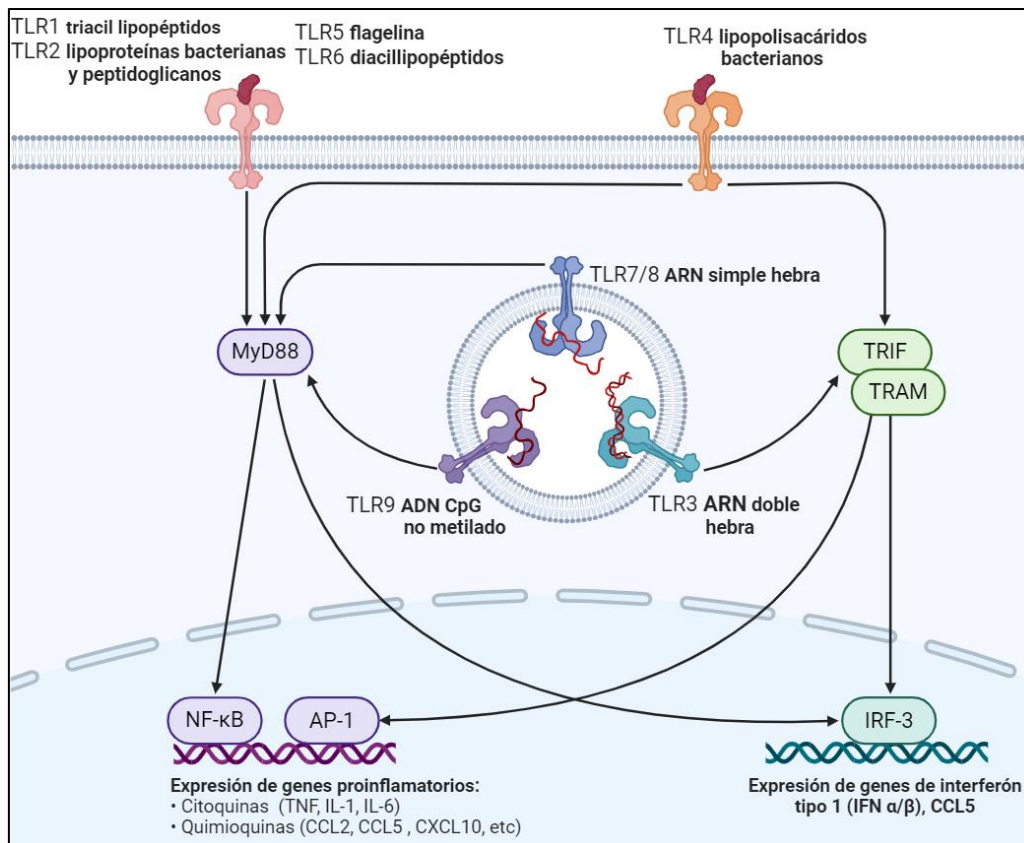


Figura 1. Reconocimiento y señalización de los diferentes TLRs. TLR1 reconoce triacil lipopéptidos, TLR2 reconoce lipoproteínas bacterianas y peptidoglicanos de bacterias Gram positivas, TLR3 reconoce ARN doble hebra, TLR4 censa lipopolisacáridos bacterianos, TLR5 reconoce flagelina, TLR2/TLR6 reconocen diacil lipopéptidos, TLR 7/8 reconocen ARN simple hebra y TLR9 reconoce ADN CpG no metilado. El reconocimiento a través de estos receptores resulta en la dimerización y reclutamiento de proteínas adaptadoras (MyD88, TRIF, TRAM), culminando en la traslocación nuclear y activación de NF-κB y AP-1 en el caso de MyD88, y la activación de IRF-3 y activación tardía del NF-κB en el caso de TRIF/TRAM. NF-κB genera la expresión de citoquinas proinflamatorias e IRF-3 lleva a la producción de IFN-β y quimioquinas (CCL5 y CXCL10). Realizado en BioRender.

Otro de los principales grupos de PRRs involucrados en la respuesta inmune innata son los sensores de ácidos nucleicos citoplasmáticos, los cuales reconocen ADN o ARN con localización aberrante y con estructuras y/o modificaciones que no están presentes en los ácidos nucleicos celulares. Dentro de estos sensores se encuentran los receptores tipo RIG-I (RLRs) como el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I), la proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5 (MDA5) y la proteína laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2) (4,14) (Figura 2). Los RLRs son helicasas que se localizan en el citoplasma de la mayoría de los tipos celulares y su función principal es discriminar entre ARNs propios y exógenos. RIG-I reconoce de manera preferencial moléculas de ARNd cortas o ARNsh con un extremo 5' trifosfato. Por otro lado, MDA5 reconoce moléculas de ARNd largas y carentes de la metilación O-2' característica de la caperza 5' de los ARN mensajeros celulares. Frente a la unión con el ligando, tanto RIG-I y MDA5 sufren cambios conformacionales y modificaciones post-traduccionales, entre ellas defosforilación y

ubiquitinación, activando su capacidad de interactuar con la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) (14) (Figura 2). MAVS promueve la activación de los factores de transcripción IRF3 e IRF7 y NF- κ B, promoviendo así la producción de interferones del tipo I y III y de citoquinas proinflamatorias, y la transcripción de genes efectores antivirales (14) (Figura 2).

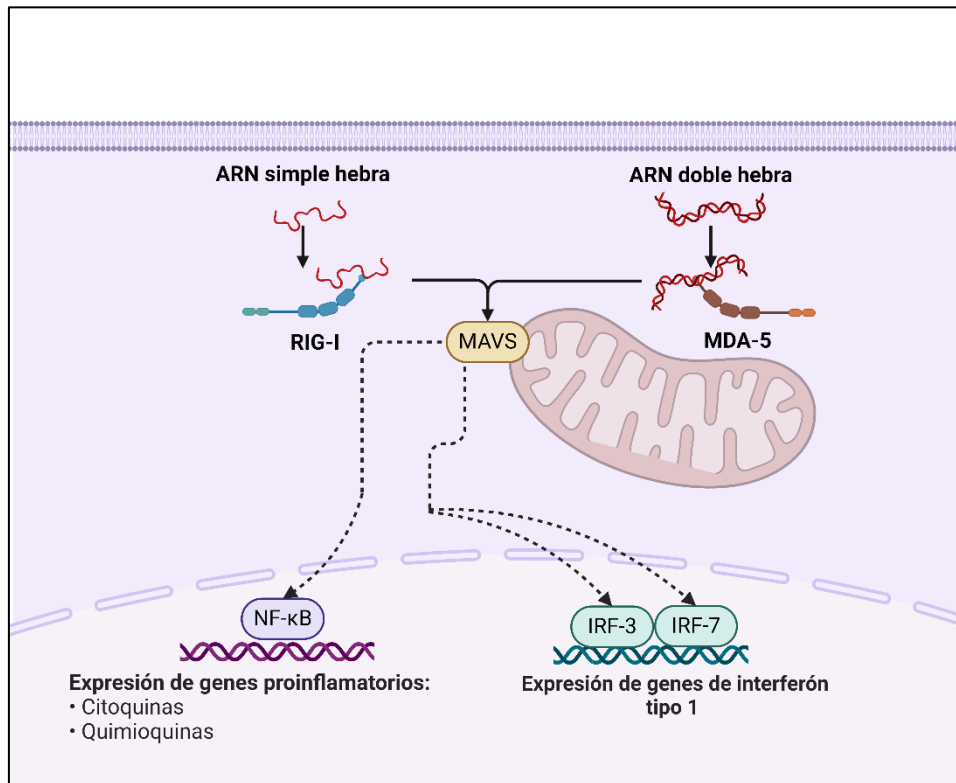


Figura 2. Reconocimiento y señalización de los RLRs; RIG-I y MDA5. RIG-I reconoce moléculas de ARN simple hebra y doble hebra cortas con un extremo 5' trifosfato y MDA5 reconoce moléculas de ARNdH más largas y carentes de la metilación O-2'. Este reconocimiento genera su interacción con MAVS, la cual recluta intermediarios que culminan en la fosforilación y activación a factores de transcripción como IRF3, IRF7 y NF- κ B, induciendo la expresión de interferones del tipo I y III, genes efectores antivirales y citoquinas proinflamatorias. Realizado en BioRender.

Finalmente, cabe destacar que la inducción temprana de citoquinas no solo potencia la respuesta inmune innata, sino que además promueve la respuesta inmune adaptativa antiviral por distintos mecanismos. Los PRRs y la producción de citoquinas proinflamatorias contribuyen a la maduración de las células dendríticas y a la estimulación y activación de linfocitos T del tipo colaborador y citotóxico. La expresión de citoquinas juega un rol importante en la activación de las células B y T, vinculando los sistemas inmunes innatos y adaptativos necesarios para eliminar una infección viral, por lo que el éxito de la inmunidad adaptativa frente a la infección depende en gran parte de la respuesta inmune innata inicial (8,15).

1.2. Flavivirus

Los virus constituyen la biomasa más grande y genéticamente más diversa del planeta, y son responsables de numerosas enfermedades infecciosas de importancia global (16). Actualmente existen factores demográficos, ambientales y ecológicos que aseguran la continua emergencia y reemergencia de virus patogénicos humanos, lo cual impactará significativamente en los sistemas de salud de distintas regiones a corto y mediano plazo (17,18). Si bien los avances biotecnológicos recientes han aportado nuevas alternativas/estrategias para prevenir y tratar infecciones virales, éstas continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. De hecho, las infecciones virales son responsables de aproximadamente el 30% de las muertes anuales asociadas a enfermedades infecciosas (19).

Dentro de los virus de importancia para la salud pública en Sudamérica se encuentran los flavivirus Dengue y Zika. Los flavivirus son virus envueltos con genoma de ARNsh linear y polaridad positiva y con un tamaño aproximado de 11 kilobases (kb). Dicho genoma cuenta con una caperuza del tipo 1 en el extremo 5' pero carece de cola poliA en el extremo 3', y contiene un marco abierto de lectura que codifica para una única poliproteína cuyo clivaje da lugar a 10 proteínas virales (2, 21) (Figura 3C). El virión de los flavivirus consiste en una ribonucleocápside asimétrica rodeada de una capa icosaédrica compuesta de las proteínas de envoltura (E) y precursora de la membrana/membrana (prM/M), dependiendo del estado de maduración de la partícula viral, ancladas a una bicapa lipídica (Figura 3A y 3B) (22). Los flavivirus cuentan con tres proteínas estructurales (cápside (C), prM y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, y NS5) (Figura 3C).

El virus dengue (DENV) es el agente etiológico de la fiebre Dengue y Dengue grave. La fiebre Dengue es una enfermedad febril aguda que causa dolor retro-orbital, mialgia, artralgia, sarpullidos, y/o leucopenia. La sintomatología distintiva de la fiebre hemorrágica Dengue o Dengue grave es trombocitopenia, manifestaciones hemorrágicas y signos de filtración de plasma, el cual puede llevar a un shock hipotensivo, que sin tratamiento adecuado puede culminar en la muerte del paciente (23). El virus Zika (ZIKV), por su parte, es el agente causal de la fiebre del Zika; aproximadamente el 80% de las infecciones por este virus son asintomáticas y el 20% de los pacientes presentan síntomas exantemáticos caracterizados por fiebre, sarpullidos, artralgia y conjuntivitis. La complicación más preocupante de la infección por ZIKV se relaciona con manifestaciones clínicas neurológicas severas como síndrome de Guillain-Barre en adultos y síndrome de Zika congénito en fetos; en estos últimos las manifestaciones incluyen microcefalia, calcificaciones subcorticales, alteraciones oculares, contracturas congénitas, hipertonia temprana y síntomas tanto piramidales como extrapiramidales (21). La vía de transmisión principal de estos virus es a través de mosquitos vectores (perteneciendo al conjunto denominado arbovirus), principalmente de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, aunque ZIKV también puede transmitirse por vía sexual, transfusiones de sangre, trasplante de órganos y de forma vertical de la madre al feto (21).

Respecto a su distribución, DENV es el arbovirus de mayor prevalencia a nivel mundial, presente en más de 100 países tropicales y subtropicales (Figura 3D). Anualmente se reportan más de 100 millones de casos de Dengue sintomáticos, y se estima que más de la mitad de la población mundial está en riesgo de ser infectada por DENV (20). De hecho, en lo que va del 2024 se han registrado más de 8 millones de casos de Dengue en las Américas, lo cual ha desafiado los sistemas de salud y gubernamentales de varios países (24). El mayor brote de ZIKV ocurrió en 2015 en Brasil cuando la Organización Mundial de la Salud declaró al virus como una emergencia de salud pública dada su rápida transmisión en las Américas y los numerosos casos de microcefalia en neonatos asociados con la infección. Actualmente, más de 80 países han reportado casos de ZIKV, y el virus continúa su diseminación hacia regiones donde el mosquito vector está presente (21) (Figura 3D).

La vacuna llamada Butantan-DV, actualmente en fase de investigación, ha demostrado la mayor eficacia (~79.6%) para prevenir infección por DENV (25). A la fecha, no existen antivirales específicos aprobados para el tratamiento de Dengue; por lo cual, comprender la respuesta inmune innata asociada a la infección por DENV y otros flavivirus es crucial para el futuro desarrollo de vacunas o antivirales efectivos (20). En el caso de ZIKV, actualmente no se cuenta con vacunas o fármacos antivirales disponibles para tratar la infección por ZIKV, aunque se han evaluado distintos candidatos vacunales en ensayos clínicos (21). No obstante, debido al número bajo de casos activos de Zika, dichos ensayos se han detenido hasta que puedan incluir más pacientes durante futuros brotes de la enfermedad (3).

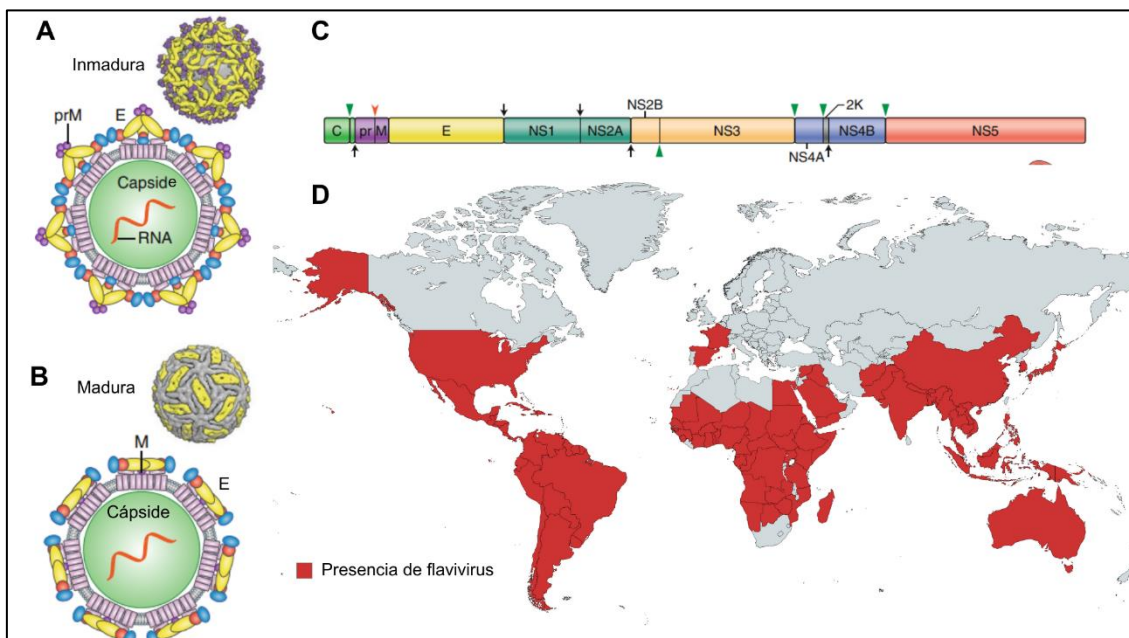


Figura 3. Estructura del virión, genoma y distribución de flavivirus. A) y B) Los diferentes arreglos de las proteínas E en los viriones inmaduros y maduros. Tomado y adaptado de (26). C) El genoma de los flavivirus codifica una única poliproteína, cuyo clivaje por proteasas celulares y virales resulta en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 proteínas no estructurales. Tomado y adaptado de (26). D) Distribución geográfica de los flavivirus ZIKV y DENV, adaptado de (27).

La proteína E es responsable de la adsorción inicial de flavivirus a la superficie celular y su principal mecanismo de entrada es la endocitosis mediada por clatrina (28). Luego de la internalización viral, las vesículas conteniendo partículas virales son dirigidas a un endosoma temprano que posteriormente madura a endosoma tardío (28). Durante este proceso, los compartimentos endosomales son acidificados, favoreciendo cambios estructurales en la envoltura viral y la subsecuente fusión con la membrana endosomal, culminando con la liberación del genoma viral en el citoplasma (Figura 4) (3,20). Si bien no se ha descrito un receptor *bona fide* para estos virus, DENV y ZIKV interactúan con diversos factores celulares para promover la infección de distintos tipos celulares, incluyendo DC-SIGN, receptores de fosfatidilserina (familias TAM y TIM e integrinas), receptores de heparán sulfato, entre otros (3,23).

Respecto a la infectividad de estos virus, DENV infecta principalmente a células inmunes del linaje mieloide, donde macrófagos y células dendríticas de la piel son las primeras células en ser infectadas. Existen reportes de infección de DENV en células endoteliales, aunque el rol de la infección de este tipo celular en la progresión de la enfermedad de Dengue aún es controversial (23). Las primeras células en ser infectadas por ZIKV son los fibroblastos de la dermis, queratinocitos epidérmicos, macrófagos de los tejidos y células dendríticas inmaduras. Las células dendríticas y macrófagos infectados transportan al virus a los ganglios linfáticos donde se replica activamente, para posteriormente difundir a la sangre, tejidos periféricos y órganos viscerales (29).

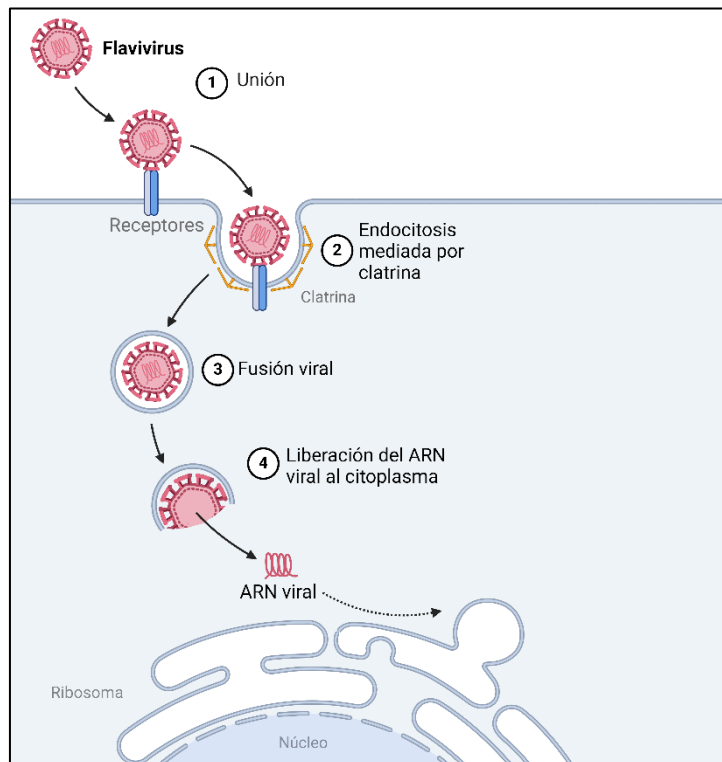


Figura 4. Entrada de flavivirus. La entrada de los flavivirus a células humanas ocurre principalmente a través de endocitosis mediada por clatrina. La fusión entre la membrana viral y la endosomal libera al genoma

viral al citosol para iniciar la replicación, transcripción y producción de nuevas partículas virales (30). Realizado en BioRender.

El ingreso de flavivirus a células del sistema inmune innato, u otros tipos celulares, es detectado por PRRs que reconocen diferentes PAMPs virales, como ser el genoma viral y moléculas intermediarias de ARN doble cadena generadas durante la replicación viral. Los PRRs involucrados en la respuesta antiviral contra ZIKV y DENV son mayoritariamente los RLRs RIG-I y MDA5 y los TLRs endosomales TLR3 y TLR7/8 (21). Además, se ha descrito que TLR4 y TLR2/6 están involucrados en el reconocimiento de la proteína NS1 de DENV, contribuyendo a la producción de citoquinas proinflamatorias (29,31). Debido a la activación de distintas vías de señalización durante la infección por flavivirus, estos virus han desarrollado numerosas estrategias para bloquear o inhibir estas respuestas antivirales mediante la actividad fundamentalmente de sus proteínas no estructurales (32). Por ejemplo, la proteína NS3 de ZIKV evita la traslocación de RIG-I y MDA5 a la mitocondria para activar MAVS. Adicionalmente, la proteína NS4A de DENV y ZIKV interactúa directamente con MAVS, también impidiendo la activación inmune mediada por RLRs, y la proteína NS5 de DENV enmascara al ARN viral metilando su extremo 5' para no ser detectado por RIG-I (5,31).

1.3. Arenavirus

Los arenavirus son una familia de virus envueltos emergentes con genoma bi-segmentado, compuesto de ARN de cadena simple y polaridad negativa (Figura 5B). En base a información serológica y filogenética, los arenavirus que infectan mamíferos (género *Mammarenavirus*) se clasifican en dos grupos principales: arenavirus del Viejo Mundo (OWA) y del Nuevo Mundo (NWA). Dentro de los OWA se incluyen virus originarios de África como el virus Lassa y el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), y dentro de los NWA se encuentran los virus Junín (JUNV), Machupo y Tacaribe (TCRV), distribuidos principalmente en las Américas (Figura 5A). Los arenavirus patogénicos, como ser Lassa, JUNV y Machupo, son transmitidos a humanos por distintas especies de ratas y ratones silvestres, mediante la inhalación de excreciones, heridas en la piel o por la ingesta de productos contaminados y pueden causar fiebre hemorrágica severa (33,34). Respecto a su modo de ingreso, los NWA ingresan a la célula por endocitosis mediada por clatrina, mientras que los OWA utilizan un mecanismo basado en macropinocitosis (34,35).

Dentro de los NWA, JUNV representa la mayor amenaza para la salud pública ya que las zonas de ocurrencia de este virus se encuentran en constante expansión por cambios en la ecología del ratón vector y en pacientes que no reciben tratamiento se registran tasas de mortalidad de hasta el 30% (36). El genoma de JUNV se compone de dos segmentos genómicos codificantes para 4 proteínas estructurales; el segmento genómico corto (S) codifica para el precursor de la glicoproteína (GP) y la nucleoproteína (NP), mientras que el segmento largo (L) codifica para la ARN polimerasa ARN dependiente y la proteína de matriz (Z) (Figura 5B) (37).

La replicación y transcripción viral se restringe al citoplasma de células infectadas, donde la ARN polimerasa cataliza la producción del ARN genómico y transcritos de polaridad positiva. La proteína Z participa de la transcripción viral y cumple un rol estructural favoreciendo la interacción de la GP con la NP (36). Se ha postulado que los NWA inicialmente infectan células centinelas del sistema inmune como los macrófagos y que estas células infectadas reclutan otros tipos celulares mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas favoreciendo la diseminación de la infección. La diseminación viral y falta de regulación inmune lleva a una tormenta de citoquinas, probablemente a través de la señalización inmune de los PRRs que reconocen el ARN viral (38).

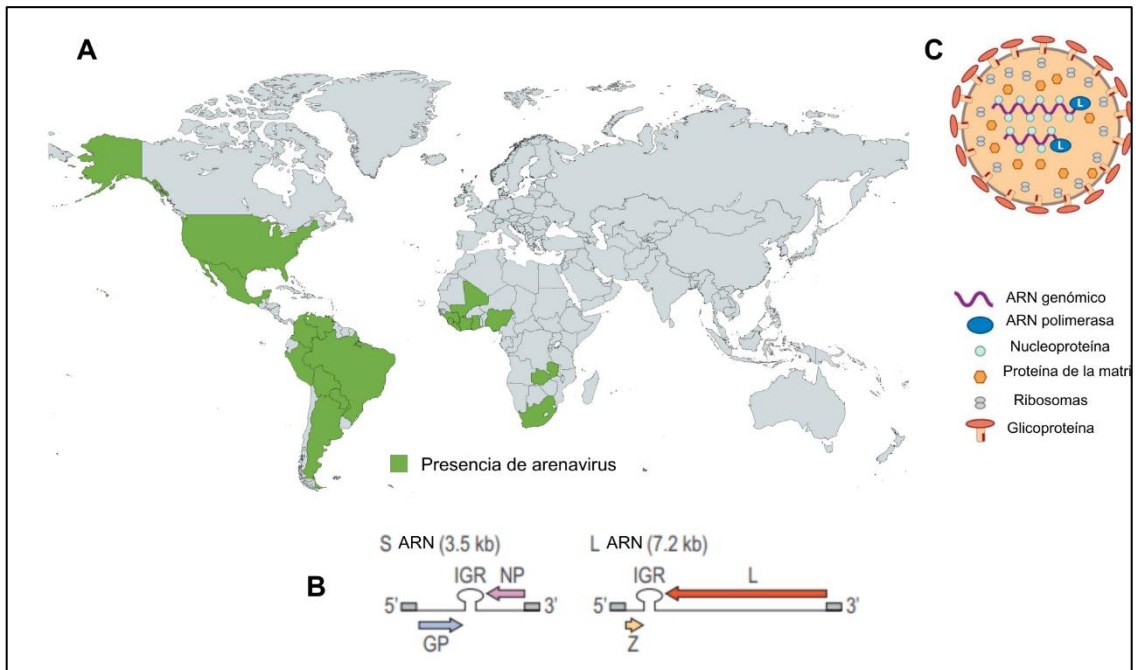


Figura 5. Distribución, estructura genómica y del virión de arenavirus. A) Distribución geográfica. B) Organización genómica mostrando los dos segmentos de ARN que componen el genoma viral. El segmento largo codifica las proteínas de la matriz (L) y la polimerasa (Z) y el corto codifica la glicoproteína (GP) y nucleoproteína (NP). C) Diagrama de la partícula viral ensamblada. Adaptado de (34).

1.4. Regulación negativa de la señalización inmune

En el transcurso de una infección viral, las células inmunes deben activarse de manera tal que la infección sea eliminada eficientemente y que las manifestaciones clínicas asociadas sean moderadas (39). Si bien la producción de citoquinas es necesaria para controlar las infecciones de manera eficaz, la hiperactivación de células inmunes y la producción de niveles elevados de citoquinas inflamatorias por períodos extensos de tiempo, conocido como tormenta de citoquinas, se asocia a efectos colaterales patológicos (21). Por ejemplo, la producción exacerbada de citoquinas en células neuronales infectadas por ZIKV contribuye a la muerte celular y la diferenciación aberrante de las células progenitoras neuronales durante el desarrollo (40); específicamente, la producción elevada de CXCL10 se asocia con varios aspectos de la neurogénesis aberrante causada por ZIKV como microcefalia y síndrome de Guillan-Barré (41).

En el caso DENV y JUNV, la producción excesiva de mediadores inmunes contribuye a cambios en la permeabilidad endotelial facilitando daño en los tejidos y fallo multiorgánico (39). Por lo tanto, la respuesta inmune frente a infecciones virales debe ser robusta, pero adecuada en magnitud y duración para prevenir cuadros más severos de la enfermedad asociados a eventos inmunopatológicos. La intensidad óptima de la respuesta inmune innata está determinada entonces por el equilibrio de señales activadoras e inhibitorias provenientes de receptores en la superficie de células inmunes y otros tipos celulares para mantener la homeostasis. Dentro de los múltiples mecanismos celulares de regulación negativa frente a infecciones se incluye la activación y señalización inhibitoria del receptor proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) (9).

1.5. Signal-regulatory protein alpha (SIRPA)

La proteína SIRPA, también conocida como SHPS-1 y CD172a, es un receptor transmembrana perteneciente a la familia de proteínas SIRP (9). SIRPA presenta un patrón de expresión relativamente amplio en comparación al resto de los miembros de la familia SIRP, expresándose en monocitos, macrófagos, granulocitos, células dendríticas, glia y neuronas (1, 41). SIRPA está comprendida por tres dominios del tipo Ig (una región variable N-terminal y dos regiones constantes), una región transmembrana y un dominio citoplasmático con dos inmunoreceptores inhibitorios basados en tirosina (ITIM) que contienen 2 residuos de tirosina cada uno (43). La fosforilación de tirosina de ambos ITIMs media el reclutamiento y la activación de las fosfatasa de tirosina con dominios de homología Src-2 SHP-1 y SHP-2, que defosforilan distintos sustratos de fosfoproteína ejerciendo un efecto inhibitorio en vías de señalización intracelulares (44). SHP-2 se expresa en la mayoría de los tipos celulares, mientras que la expresión de SHP-1 se restringe principalmente a células hematopoyéticas y epiteliales (43).

La función mejor caracterizada de SIRPA es su rol inhibitorio en la fagocitosis mediada por actina filamentosa. La unión de SIRPA con el receptor CD47 en trans desencadena la fosforilación de SIRPA, el reclutamiento de las fosfatasa SHPs y el inicio de una cascada de señales inhibitorias que culmina con el bloqueo de la fagocitosis por macrófagos y células dendríticas (44). La interacción SIRPA-CD47 es considerada una señal de "no me comas" debido a que previene la ingestión fagocítica de células viables (43). Las células cancerígenas explotan esta señalización, regulando positivamente la expresión de CD47 en su superficie para evitar la ingestión por fagocitos en el microambiente tumoral (Figura 6) (44).

Por su parte, nuestro grupo demostró que, similar a su rol en la fagocitosis, SIRPA restringe la internalización de virus envueltos que explotan vías endocíticas para ingresar a las células, incluyendo arenavirus (JUNV, LCMV y TCRV), rhabdovirus (virus de la estomatitis vesicular (VSV)) y flavivirus (ZIKV) (Figura 6). La restricción de la entrada viral mediada por SIRPA depende de su dominio citoplasmático e involucra un mecanismo independiente de CD47, debido a que el reconocimiento de CD47 "viral" adquirida por las partículas virales durante su brotamiento de células hospederas no limita su endocitosis en células expresando SIRPA (44).

Debido a la marcada actividad antiviral de SIRPA, su función puede ser explotada terapéuticamente para limitar la infección en etapas tempranas, mientras ocurre la activación del sistema inmune.

Además de regular la fagocitosis y ser un factor celular de restricción viral, la actividad de SIRPA también se asocia a la regulación de las vías de señalización MAPK y NF- κ B, inhibiendo la respuesta inflamatoria de macrófagos y granulocitos (Figura 6) (9,45,46). En este sentido, resultados preliminares de nuestro grupo mostraron que tras la estimulación con moléculas agonistas de TLRs, macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones *Sirpa knockout* (KO) presentaron mayor expresión de citoquinas proinflamatorias, en comparación con BMDMs aislados de ratones C57BL/6 *wild-type* (WT). Debido a estos antecedentes, actualmente estamos analizando si SIRPA también tiene una función inmunomoduladora durante infecciones virales.

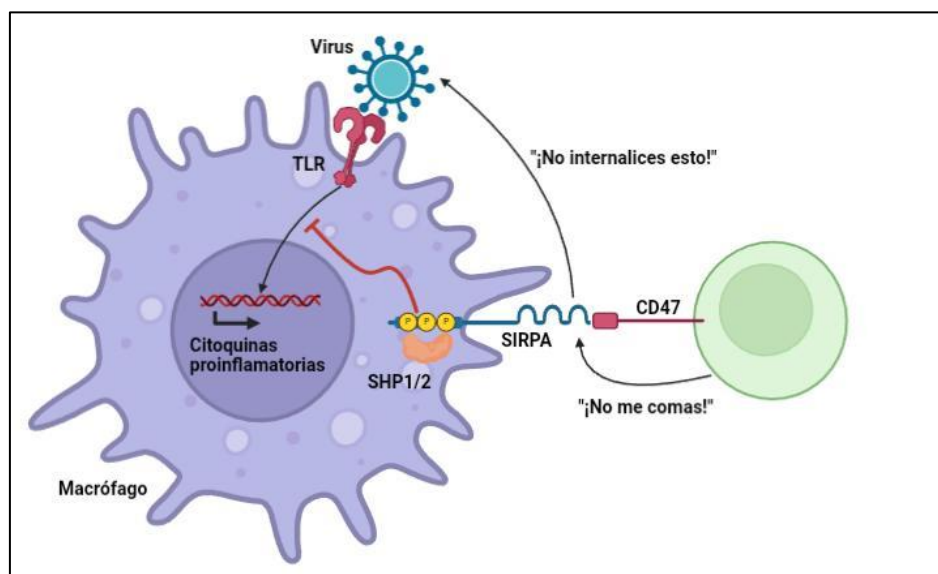


Figura 6. Funciones de SIRPA como inhibidor de la fagocitosis, factor de restricción viral y regulador de la inmunidad innata. La interacción SIRPA-CD47 desencadena la fosforilación de tirosina de los ITIMs, reclutando y activando a SHP-1 y SHP-2, las cuales defosforilan sustratos de fosfoproteína inhibiendo la fagocitosis. Adicionalmente, nuestro grupo demostró que SIRPA restringe la internalización de virus envueltos que explotan vías endocíticas y también se mostró que su actividad está involucrada en la regulación negativa de las vías de señalización MAPK y NF- κ B. Realizado en BioRender.

1.6. Péptidos sintéticos

Desde la síntesis del primer péptido terapéutico, la insulina en 1921, se ha aprobado la utilización de más de 80 fármacos basados en péptidos (47). Estos fármacos representan una porción significativa del mercado farmacéutico mundial en la actualidad, con ventas por más de US\$ 70 mil millones en 2019. De hecho, dentro de los 200 fármacos con mayores ventas en 2019, 10 de ellos correspondieron a formulaciones basados en péptidos sintéticos (47). Dentro de los péptidos antivirales comerciales, el primero en aprobarse para su uso terapéutico fue enfuvirtida (T20) en 2003, un péptido mimético de la subunidad gp41 del virus HIV-1 que inhibe

la fusión viral a nivel de la membrana plasmática (48). Asimismo, durante la pandemia de COVID-19 se evaluaron numerosos péptidos anti-SARS-CoV-2 en líneas celulares para su posterior utilización en modelos animales pre-clínicos (49).

Los péptidos terapéuticos son una clase de agentes farmacéuticos que se componen de una serie de aminoácidos en orden secuencial, usualmente con pesos moleculares de entre 500 a 5000 Da. Son moléculas pequeñas, de fácil diseño y síntesis y bajos costos de producción, que comúnmente cumplen funciones de hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, ligandos de canales iónicos o agentes antimicrobianos (47,50). Estos péptidos se unen a receptores de la superficie celular con alta afinidad y especificidad y activan vías de señalización intracelulares con modos de acción similares a los fármacos biológicos, pero generando menor inmunogenicidad (47). Para contrarrestar infecciones virales, se han diseñado péptidos que pueden actuar como moléculas miméticas virales que interactúan con los receptores de la célula previniendo la entrada viral, agentes virucidas, o vacunas basadas en epítopes péptidicos (50).

El uso de péptidos sintéticos como alternativa a las estrategias terapéuticas tradicionales se destaca por su fácil escalado en la producción, especificidad en la respuesta inmune, alta pureza, seguridad y costos, entre otros. Actualmente, más de 70 fármacos están aprobados en Estados Unidos y 200 se encuentran en ensayos clínicos, lo que evidencia el potencial de los péptidos como una alternativa farmacológica (50). La mayoría de los compuestos antivirales utilizados actualmente se basan en análogos de nucleósidos, los cuales tienen eficacia variable, provocan diversos efectos secundarios, y son capaces de generar resistencia viral. Por lo tanto, la demanda para desarrollar nuevos fármacos es muy alta, con una mayor preferencia por moléculas con actividad antiviral de amplio espectro (51).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Debido a la función inhibitoria de SIRPA en la entrada viral, el objetivo principal de este trabajo es determinar si SIRPA tiene una función regulatoria negativa sobre la respuesta inmune frente a infecciones virales y moléculas agonistas de TLRs y RLRs representativas de distintos componentes virales. Además, evaluaremos el potencial antiviral e inmunomodulador de péptidos sintéticos derivados del dominio citoplasmático de SIRPA y fusionados al *self-penetrating peptide* Tat de HIV-1 en líneas celulares humanas y en células primarias de ratón, utilizando los virus DENV, ZIKV y JUNV.

Los resultados de este trabajo aportarán información novedosa acerca de la biología y activación de SIRPA en el contexto de infección viral, así como su potencial utilidad terapéutica para limitar infecciones virales y respuestas inmunes exacerbadas. De esta manera, aportaremos elementos para el posterior desarrollo de biofármacos antivirales activos contra virus de importancia para la salud pública en la región.

2.2. Objetivos específicos

- Ampliar el análisis de la actividad antiviral de SIRPA analizando flavivirus de importancia para la salud pública.
- Determinar el rol de SIRPA en la señalización inmune frente a infecciones virales, considerando que la magnitud adecuada y el equilibrio de las respuestas anti y proinflamatorias es crucial para la prevención de inmunopatología luego de la infección.
- Establecer el rol de la fosforilación del ITIM-1 en la actividad de SIRPA, mediante la evaluación in vitro y ex vivo de péptidos sintéticos derivados de este motivo.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivo celular

Células A549 (adenocarcinoma de pulmón) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Thermo), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) y gentamicina/anfotericina (Thermo) a 37°C y 5% CO₂. Cada 72-96 horas (h) se realizaron pasajes 1 en 5 para propagar la línea.

3.2. Generación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)

Se aislaron células progenitoras mieloides de la médula ósea de las extremidades posteriores de ratones *Sirpa*^{tm1Ynlu/J} (*Sirpa knockout*; *Sirpa KO*) provenientes de Jackson Laboratories y ratones C57BL/6 (*wild-type*; WT) como control, según se detalla en el Anexo 1 (protocolo desarrollado por nuestro laboratorio). Los macrófagos se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% SFB, 2,5% HEPES (Invitrogen), 0,1% piruvato de sodio (Gibco) y 100 µg/mL del factor de estimulación de colonias de macrófagos M-CSF (Stemcell). Luego de 7 días las células fueron sembradas en placas de 24 o 48 pocillos para realizar diferentes ensayos.

3.3. Extracción de ARN y retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total fue extraído de las células (A549 y macrófagos derivados de médula ósea) con el kit GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) según se detalla en el protocolo del fabricante. La retrotranscripción (RT) del ARN se realizó con la enzima transcriptasa reversa RevertAid (Thermo Scientific) empleando los reactivos detallados en la Tabla 1 y usando el programa presentado en la Figura 7 en el termociclador MultiGene OptiMax Thermal Cycler, indicado por el fabricante. Posteriormente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) utilizando el ADN complementario (ADNc) resultante de la RT empleando el reactivo Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo #4367659) como se detalla en la Tabla 2 junto con cebadores específicos (primers) para la amplificación de distintos genes. La qPCR se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System siguiendo el programa presentado en la Figura 8 (puesto a punto por nuestro laboratorio) y los reactivos de la Tabla 3 (según especificaciones del fabricante).

Tabla 1. Reactivos utilizados en la reacción de retrotranscripción (RT).

	Reactivo	Volumen (μL)
Mix 1	Hexámeros al azar (50 ng)	1
	ARN (50-100 ng)	5
	ddH ₂ O	7,5
Mix 2	dNTPs (10 mM)	2
	Buffer	4
	Retrotranscriptasa RevertAid	0,5

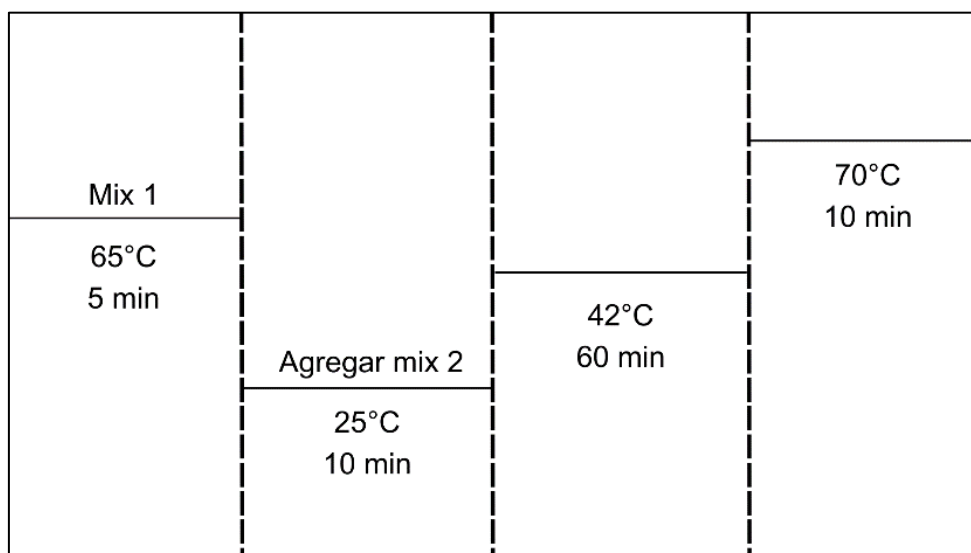


Figura 7. Programa utilizado para la reacción RT. Se indica la temperatura y el tiempo de incubación de cada paso.

Tabla 2. Listado de cebadores específicos utilizados durante ensayos de qPCR, diseñados por nuestro laboratorio.

Gen	Cebador hacia delante	Cebador reverso
mIL-6	5'-AGA CT CAC AGA GGA TAC CAC-3'	5'-ATT TCC TGA TTA TAT CCA GTT TG-3'
hIFN- β	5'-CAT TAC CTG AAG GCC AAG GA-3'	5'-CAA TTG TCC AGT CCC AGA GG-3'
MxA	5'-ACC ACA GAG GCT CTC AGC AT-3'	5'-CT AGC TGG TCC TGG ATC TC-3'
mTNF- α	5'-GCC ACC ACG CTC TTC TGT CT-3'	5'-GGT CT GGC CAT AGA ACT GAT G-3'
hmCCL2	5'-CTT CTG TGC CTG CTG CTC ATA G-3'	5'-CAC TTG CTG CTG GTG ATT CT-3'
mIFN- β	5'-TCA ACT ATA AGC AGC TCC AGC-3'	5'-TGA GGT TGA TCT TTC CAT TCA-3'
mSIRPA	5'-CAT CCA GCC AGC CAA TCC TGT-3'	5'-TCC AGT TCG CCC TCT GGT TCT-3'
TNF- α	5'-TGA AGA GGA CCT GGG AGT AGA-3'	5'-CAG GCA GTC AGA TCA TCT TCT-3'
IL6	5'-AGA TTC CAA AGA TGT AGC CGC-3'	5'-GTC TCC TCA TTG AAT CCA GAT TG-3'
mCCL5	5'-CCA TCA TCC TCA CT CAG CCG CC-3'	5'-AGC ACT TGC CAC TGG TGT AGA-3'
hCCL5	5'-CTG TCA TCC TCA TTG CTA CT CC-3'	5'-AGC ACT TGC CAC TGG TGT AGA-3'
hmCXCL10	5'-TCA GCA CCA TGA ATC AAA CT-3'	5'-GCA GGT ACA GCG TAC AGT-3'
GAPDH	5'-CCC CTT CAT TGA CCT CAA CTA CA-3'	5'-CGC TCC TGG AGG ATG GTG AT-3'
hSIRPA	5'-TTC CAG TGC CT CCA GCC CT-3'	5'-GGT GAT GTT ACC GAT GCG GAT G-3'
DENV2-C	5'-AGA TTC TCA CTT GGA ATG CTG C-3'	5'-CTC TTC AGT ATC CCT GCT GTT-3'
ZIKV-prE	5'-CAG CAA TAG AGA CT CGT GGA-3'	5'-GTA GGC TC ACC TTG TGT TGG-3'
JUNV-S	5'-GGG GCA GTT CAT TAG CT CAT GC-3'	5'-CAA AGG TAG GTC ATG TGG ATT GTT GG-3'

Tabla 3. Reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Reactivo	Volumen (1 tubo)
Master mix (SYBR green) (2X)	5 μ L
Primer Forward (10 μ M)	0.2 μ L
Primer Reverse (10 μ M)	0.2 μ L
cDNA (100-250 ng/ μ l)	2 μ L
ddH ₂ O	2.6 μ L
	Vf = 10 μ L

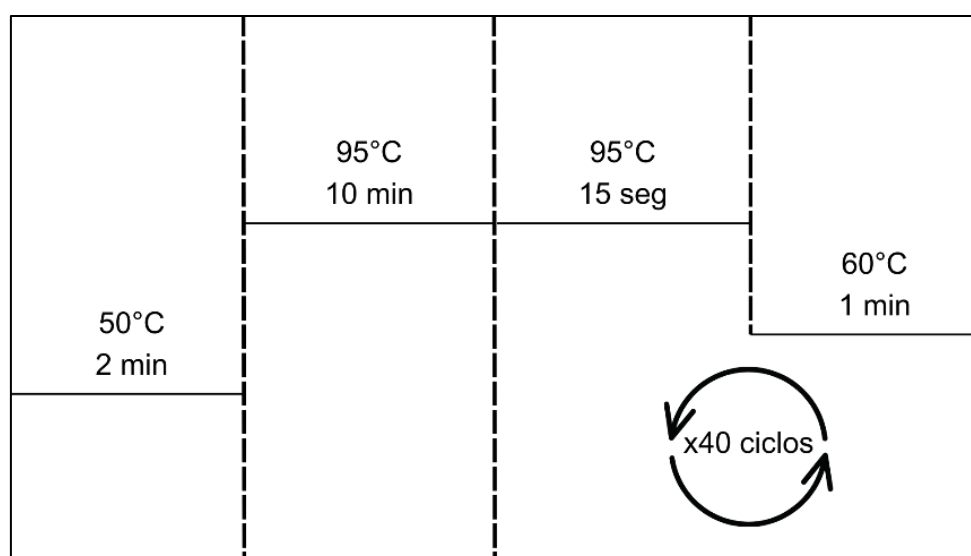


Figura 8. Programa utilizado para qPCR. Se indica la temperatura, el tiempo y el número de ciclos de cada paso

3.4. Análisis de la expresión de SIRPA mediante western blot

Se sembraron BMDMs WT y Sirpa KO en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂. Las células fueron lisadas con buffer RIPA suplementado con el inhibidor de proteasas Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo), posteriormente sonicadas por 15 segundos (s), y el sobrenadante se clarificó por centrifugación a 13.000 rpm. Los lisados proteicos se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y para la transferencia se utilizaron membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore). Se determinó la expresión de SIRPA empleando un anticuerpo anti-SIRPA (#13379; Cell Signaling Technologies (CST)).

3.5. Estimulaciones con moléculas agonistas de TLRs y RLRs

Se sembraron células A549 o BMDMs en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C por 24 h, hasta llegar a una confluencia de 80%. Para las estimulaciones con los agonistas sintéticos de TLRs (Sigma), se diluyeron en 200 µL de DMEM 2% SFB y se utilizaron concentraciones reportadas en estudios previos: 10 µg/mL poly(I:C) (ácido poliinosínico-policitidílico, análogo de ARNdH estimulante de TLR3), 2 µg/mL LPS (lipopolisacárido bacteriano, agonista de TLR4), 1 µg/mL R848 (Resiquimod, agonista de TLR7/8), 1 µg/mL FSL-1 (lipoproteína sintética derivada de bacteria, agonista de TLR2/6) y DMSO (vehículo), durante 8, 24 y 48 h [14]. Para estimular los RLRs, se transfectaron 10 ng del agonista poly(I:C) durante 8 y 48 h, utilizando el reagente Lipofectamine 3000 (Invitrogen) según el protocolo descrito por el fabricante (Anexo 1). Posteriormente, se aisló el ARN total, se sintetizó el ADNc y se determinó la expresión de los factores proinflamatorios e interferón-β mediante qPCR como fue descrito en el punto 3.3.

3.6. Infecciones virales

Se sembraron células A549 o BMDMs en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C hasta llegar a una confluencia de 70%. Posteriormente, se infectaron con la cepa PRVABC59 de ZIKV, la cepa Nueva Guinea C de DENV genotipo 2 o la cepa vacunal Candid #1 de JUNV, utilizando DMEM 2% SFB para diluir el stock viral e inocular las células con la multiplicidad de infección (MOI) según el experimento detallado en cada figura. Cada pocillo se infectó con 150 µL de la dilución viral y la placa se incubó por 1 hora a 37° C agitando cada 15 minutos. Luego, se retiró el inóculo, se lavó la monocapa con 1X PBS y se agregaron 500 µL de DMEM 10% SFB por pocillo para incubar a las células a 37°C por 48 h. Finalmente, se realizó el aislamiento de ARN total y la síntesis de ADNc para analizar los niveles de infección e inducción de factores proinflamatorios e interferón.

3.7. Silenciamiento de SIRPA mediante ARN de interferencia corto

El silenciamiento de la expresión endógena de SIRPA en células A549 se realizó con el reactivo Lipofectamine RNAiMax (Thermo) según el protocolo detallado por el fabricante (Anexo 1). Se utilizó un ARN de interferencia corto (siRNA) que hibrida con el exón 6 del transcripto de SIRPA, denominado siSIRPA (#AM51331, Thermo) y un siRNA control el cual no presenta hibridación a ningún ARNm celular conocido (siCtrl) (Thermo). A las 48 h post-transfección del siRNA, se prosigió con las infecciones o estimulaciones según cada ensayo.

3.8. Síntesis de péptidos sintéticos derivados de SIRPA

Los péptidos utilizados en este trabajo fueron diseñados por nuestro grupo y sintetizados por el método de síntesis en fase sólida en el laboratorio de Ingeniería de péptidos y farmacoterapia dirigido por el Dr. Chatenet en el *Institut national de la recherche scientifique*

(Canadá). Dichos péptidos se basan en el ITIM-1 del dominio citoplasmático de SIRPA y fueron modificados para aumentar su estabilidad (amidación del extremo C-terminal; NH₂) y flexibilidad (adición de ácido 6-aminohexanoico; Ahx), y se fusionaron a la secuencia GRKKRRQRRR derivada de la proteína Tat del virus HIV-1 (47), perteneciente a la familia de los “self-penetrating peptides”, para facilitar su internalización celular. Adicionalmente, para determinar la localización subcelular de los péptidos después de la internalización, se conjugó el péptido ITIM-1 al fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) en su extremo N-terminal luego del motivo Ahx, de manera de prevenir interacciones no específicas entre el fluorocromo y determinados residuos de la secuencia peptídica. La secuencia de los péptidos utilizados se encuentra a continuación y su estructura y caracterización química se detallan en el Anexo 2.

ITIM-1 WT: Ac-GRKKRRQRRR-Ahx-NDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQT-NH₂

ITIM-1 FITC: FITC-Ahx-GRKKRRQRRR-Ahx-DITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQT-NH₂

3.9. Microscopia de epifluorescencia

Para visualizar la localización del péptido fusionado a FITC (ITIM-1-FITC), se sembraron células A549 en placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar confluencia. Se realizaron diluciones del stock del péptido en DMEM 10% a distintas concentraciones y se incubaron las células con el péptido por 1, 6 y 24 h a 37 °C previamente a su visualización. Luego, se prosiguió con la fijación y montaje de las células utilizando el medio Vectashield (Vector Laboratories), el cual contiene DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para teñir ADN, según el protocolo del Anexo 1. Para analizar las distintas concentraciones y tiempos de incubación del péptido se utilizó un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX81. Además, se determinó la citotoxicidad del péptido a la concentración de 100 µM según lo descrito en el Anexo 2.

3.10. Análisis de la actividad antiviral e inmunomoduladora de los péptidos derivados de SIRPA

Para evaluar el potencial antiviral e inmunomodulador del péptido ITIM-1 WT, se sembraron células A549 o BMDMs en placa de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una confluencia de 70-80%. Luego, se trataron a las células con el péptido a 37 °C por distintos intervalos y por último se realizó la estimulación o infección de las células según cada ensayo.

4. Resultados y discusión

4.1. Estimulación de TLRs y RLRs en células A549

Además de las células del sistema inmune, las células epiteliales también son células diana de infecciones virales (12). El tracto respiratorio es una de las principales rutas de ingreso de patógenos, por lo cual cuenta con mecanismos altamente regulados de respuesta a microorganismos invasores (52). En particular, la línea celular humana A549 se usa como sustituto del epitelio alveolar para analizar factores proinflamatorios e interferones inducidos por la estimulación de distintos PRRs (53). De acuerdo con esta premisa, se caracterizó la respuesta inmune innata asociada al tratamiento con agonistas sintéticos de TLRs representativos de glicoproteínas y ácidos nucleicos virales en la línea A549. Para ello, las células fueron tratadas con poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), R848 (TLR7/TLR8) y FSL-1 (TLR2/TLR6), utilizando concentraciones previamente descritas (11). Se analizó la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, IFN-I luego de estimulaciones de diferente duración (8, 24 y 48 h), utilizando al gen *housekeeping* GAPDH como referencia para cuantificación relativa mediante RT-qPCR. Estos experimentos fueron considerados para analizar posteriormente estas citoquinas en células A549 infectadas con ZIKV y DENV y/o tratadas con el péptido ITIM-1 WT.

En las estimulaciones por 8 h, observamos niveles elevados de expresión de TNF- α para los agonistas FSL-1 y R848, mientras que no detectamos expresión de IFN- β para ninguno de los agonistas (Figura 9). En cuanto a las quimiocinas, se observa una inducción significativa de CCL5 con FSL-1 y una ausencia de inducción de CXCL10 para todos los agonistas analizados (Figura 9). Al estimular por 24 h, detectamos niveles moderados de expresión de TNF- α para poly(I:C), LPS y FSL-1 y de IFN- β para poly(I:C), niveles elevados de CCL5 para FSL-1 y ausencia de expresión de CXCL10 para todos los agonistas (Figura 9). A las 48 h no detectamos inducción de IFN- β , pero observamos expresión significativa de TNF- α en los tratamientos con LPS y FSL-1, niveles moderados de CCL5 para FSL-1 y ausencia de inducción de CXCL10 (Figura 9). Así, establecimos que la estimulación de células A549 difiere entre agonistas en cuanto a los factores proinflamatorios e interferones que se expresan y sus niveles de expresión.

Resulta llamativa la expresión moderada de IFN- β para los agonistas e intervalos evaluados, ya que se ha reportado una robusta inducción de esta vía de señalización para en células tratadas con LPS (54). De la misma manera, no se observó inducción de CXCL10 en ningún caso, posiblemente por su dependencia de la expresión de IFN- β (55). Si bien la expresión de esta quimiocina es inducida por IFN-I, se ha reportado que éstas pueden ser producidas directamente por la activación de IRF-3, de forma independiente a IFN-I (39). Por otro lado, la citoquina proinflamatoria TNF- α se expresa a mayores niveles a las 8 y 48 h, especialmente con FSL-1 y LPS. Esta expresión significativa se encuentra generalmente acompañada de una fuerte inducción de CCL5, correlación que se observa principalmente a las 48 h, puesto que la producción de CCL5 es inducida tardíamente por TNF- α durante infecciones microbianas (56).

En células A549 la marcada inducción de citoquinas inflamatorias con FSL-1 y LPS involucraría a las vías de señalización dependientes de MyD88, aunque el LPS también es capaz de activar vías dependientes de las proteínas adaptadoras TRIF/TRAM (57).

Es importante señalar que la expresión de ciertos TLRs en células A549, y por lo tanto las vías de señalización reguladas por su estimulación, es controversial. Existen reportes de expresión indetectable de TLR7 y TLR8, y en consecuencia una ausencia de respuesta frente a la estimulación con su ligando R848 (12), aunque observamos una regulación positiva de TNF- α a las 8 h post-estimulación para este agonista (Figura 9). Asimismo, se ha reportado que la expresión basal de TLR3 en estas células es baja, y que la misma no aumenta frente al tratamiento con poly(I:C), de manera tal que este agonista no induciría la transcripción de citoquinas, aunque nosotros detectamos expresión de TNF- α e IFN- β a las 24 h (12). Al igual que lo reportado para TLR3, TLR7 y TLR8, la expresión de TLR4 y de las proteínas accesorias CD14 y MD-2 también es controversial (9). CD14 y MD-2 se unen directamente a LPS facilitando su interacción con TLR4 y, por lo tanto, asegurando la señalización mediada por este receptor incluso a concentraciones bajas de LPS. Estudios previos han demostrado expresión de TLR4 y CD14 en células A549; sin embargo, se ha reportado que en esta línea celular es necesaria la adición de CD14 soluble junto a LPS para activar la respuesta mediada por TLR4 (52). Por otra parte, Knez y cols. observaron una regulación positiva de TNF- α tras la estimulación de células A549 por 4 h con LPS (11), similar al aumento que detectamos en la expresión de TNF- α a las 24 h y de CCL5 a las 48 h post-tratamiento con LPS.

A pesar de la discrepancia acerca de la expresión de determinados TLRs en células A549, es posible que el tratamiento con agonistas de TLRs esté activando a la vía de señalización dependiente de TLR10 y favoreciendo la inducción de citoquinas. Aunque todavía no se han descrito los ligandos y la función de este receptor al detalle, se ha demostrado que es activado en respuesta a FSL-1, LPS y poly(I:C). Se ha postulado que luego de la unión al ligando, TLR10 forma un homodímero o un heterodímero con miembros de la subfamilia de TLR2 y señalizar a través de MyD88 (11). En nuestro trabajo, la estimulación con poly(I:C) resultó en la mayor expresión de IFN- β , pudiendo estar relacionado a la estimulación de distintos TLRs.

Según nuestros resultados, los agonistas LPS y FSL-1 indujeron los niveles de expresión más elevados de factores proinflamatorios a las 48 h (Figura 9). Estos agonistas representan lipopolisacáridos y lipoproteínas bacterianas, respectivamente, aunque en el contexto de infecciones virales tanto TLR4 como TLR2/6 pueden ser activados por proteínas virales (57).

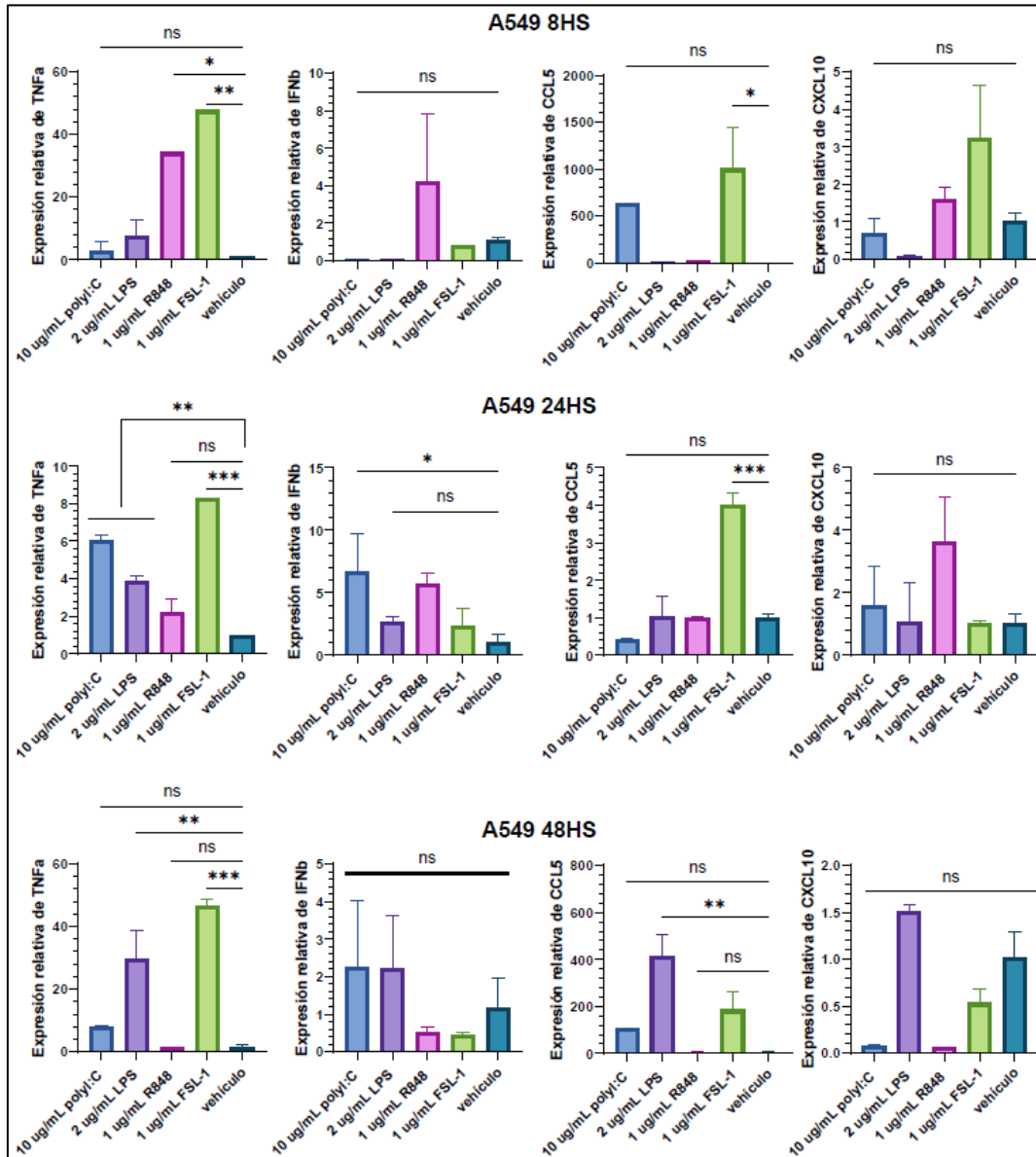


Figura 9. Expresión relativa de los factores proinflamatorios TNF- α , CCL5 y CXCL10, e IFN- β luego de estimulaciones de 8, 24 y 48 h con los agonistas poly(I:C), LPS, R848 y FSL-1 en células A549, determinado mediante RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales donde se utilizó el análisis ordinary one-way ANOVA para determinar la significancia. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,001$, ***, $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

Para evaluar la señalización dependiente de los RLRs citosólicos en células A549, transfectamos 10 ng de poly(I:C), molécula mimética de ARN corto doble cadena, y evaluamos la inducción de factores proinflamatorios e IFN- β . A las 48 h post-transfección, detectamos niveles de expresión elevados de TNF- α , CCL5 y CXCL10, así como de IFN- β (Figura 10). En contraste a lo reportado para TLRs, se ha establecido una potente inducción de las vías dependientes de los RLRs frente a distintos estímulos en células A549; específicamente, se ha reportado que Mda5 y RIG-I reconocen a poly(I:C) transfectado, estimulando la producción de factores proinflamatorios e IFN-I (58, 59). Asimismo, la expresión de los RLRs aumenta significativamente en respuesta a IFN-I e infecciones virales, amplificando la señalización inmune

que estos sensores regulan (59). En base a estos resultados, analizaremos la señalización mediada por los receptores RLRs en células A549 infectadas con los flavivirus ZIKV y DENV y el rol de SIRPA en estas vías de respuesta inmunes.

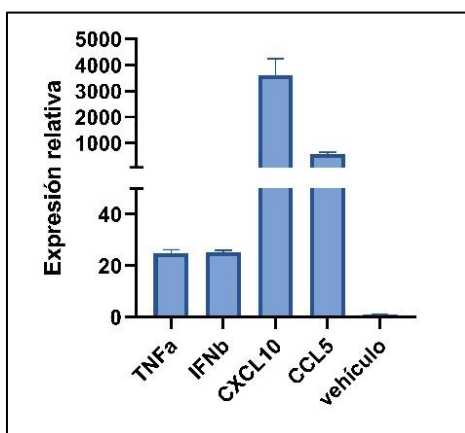


Figura 10. Expresión relativa de los factores proinflamatorios TNF- α , CCL5 y CXCL10 e IFN- β 48 h post-transfección de poly(I:C) en células A549, determinado mediante RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales calculado con GraphPad.

4.2. Caracterización de la respuesta inmune en células A549 frente a infección con flavivirus

Para evaluar la respuesta inmune innata frente a infecciones virales, se infectaron células A549 con ZIKV a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y se analizaron los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6, citoquina proinflamatoria inducida tempranamente frente a infecciones, de las quimioquinas CXCL10, CCL5 y CCL2, y de IFN- β a las 48 h, analizando también los niveles de infección con respecto a células control no infectadas (MOCK). En células infectadas con ZIKV, observamos una elevada expresión de los factores proinflamatorios TNF- α , IL-6, CCL5 y CXCL10 y moderada de CCL2, aunque significativa respecto a las células no infectadas. Además, los niveles de expresión de IFN- β indican una inducción moderada (Figura 11). Al igual que lo observado en las estimulaciones con agonistas sintéticos, la elevada expresión de factores proinflamatorios podría asociarse a la señalización por vías independientes del IFN-I, como ser las reguladas por NF- κ B (56).

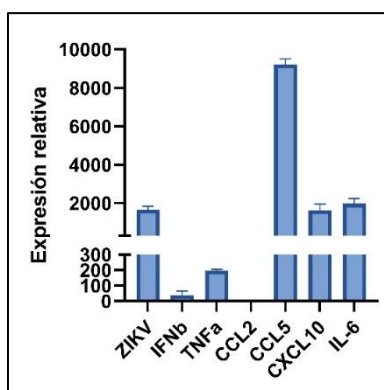


Figura 11. Niveles de ARN viral y expresión relativa de IFN- β y los factores proinflamatorios TNF- α , CCL2, CCL5, CXCL10 e IL-6 luego de la infección con ZIKV a un MOI de 1 por 48 h en células A549, determinado mediante RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales.

Según estudios previos, la infección de células A549 por ZIKV induce la producción de IFN- β y regula positivamente la expresión de citoquinas proinflamatorias 48 h luego de la infección (14). Se ha propuesto que las vías de señalización mediadas por RIG-I se activan tempranamente durante la infección, mientras que la activación de Mda5 ocurre en etapas más tardías del ciclo replicativo, debido a que los intermediarios de ARNdh viral se hacen accesible luego de su liberación desde los compartimientos de replicación (32). En nuestro caso, observamos una marcada inducción de factores proinflamatorios y moderada de IFN- β (Figura 11). Si bien la cepa PRVABC59 de ZIKV induce una potente respuesta antiviral, caracterizada por la producción de IFN- β en los mismos puntos de tiempo aquí analizados, los mecanismos de inhibición de la respuesta inmune antiviral de flavivirus pueden limitar o demorar la activación de las vías de IFN-I, promoviendo la infección, replicación y diseminación viral (8, 28, 61-63). En particular, la infección con ZIKV resulta en una reducción y retraso en la activación de IRF3, lo cual podría explicar la respuesta moderada de IFN-I frente a la infección con ZIKV aquí observada (28). De igual manera, el flavivirus DENV presenta los mismos mecanismos de evasión inmune (30). Realizamos infecciones con DENV MOI 0.5, y a pesar de la detección de altos niveles de ARN viral (Figura 12), no se detectó expresión de factores proinflamatorios ni de IFN- β a las 48 h.

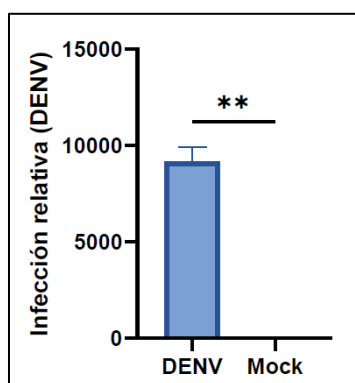


Figura 12. Niveles de ARN viral luego de la infección con DENV a un MOI de 0.5 por 48 h en células A549, determinado mediante RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales donde se utilizó unpaired T-test para determinar la significancia. *, $P \leq 0,05$ **, $P \leq 0,001$, ***, $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

4.3. Estimulación de TLRs y RLRs en macrófagos primarios murinos

Debido al rol primordial de los macrófagos en la respuesta inmune innata frente a patógenos invasores (2), también analizamos la producción de factores inflamatorios e IFN- β en

macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) de ratones C57BL/6 (*wild-type*; WT) estimulados con los agonistas de TLRs poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), R848 (TLR7/TLR8) y FSL-1 (TLR2/TLR6) por 8 y 48 h, con las concentraciones y condiciones antes descritas.

A las 8 h post-estimulación, se observaron elevados niveles de TNF- α , IL-6 y CCL5 con todas las condiciones analizadas, especialmente para el tratamiento con poly(I:C) (Figura 13). Los niveles de expresión de IFN- β más elevados en este intervalo se observaron para la transfección con poly(I:C), pero también detectamos inducción para el tratamiento con este agonista (Figura 13). Estos resultados sugieren que la estimulación de TLR3 media principalmente la producción de citoquinas inflamatorias y quimiocinas, y los RLRs la producción de IFN-I en macrófagos primarios murinos en etapas tempranas. El análisis a las 48 h reveló que solamente CCL5 se expresa a niveles elevados y que incluso ocurre un aumento de expresión que podría asociarse a la inducción temprana de TNF- α , al igual que lo observado en células A549 (Figura 9). En términos generales, observamos una mayor expresión de factores proinflamatorios e IFN- β en los BMDMs en comparación con las células A549, la cual está mediada principalmente por TLR3 (independiente de MyD88), mientras que en células A549 la inducción fue mayor para TLR2/6 y TLR4 (dependientes de MyD88), evidenciando el rol diferencial de TLRs y de proteínas adaptadoras (TRIF/TRAM y MyD88) entre ambos tipos celulares.

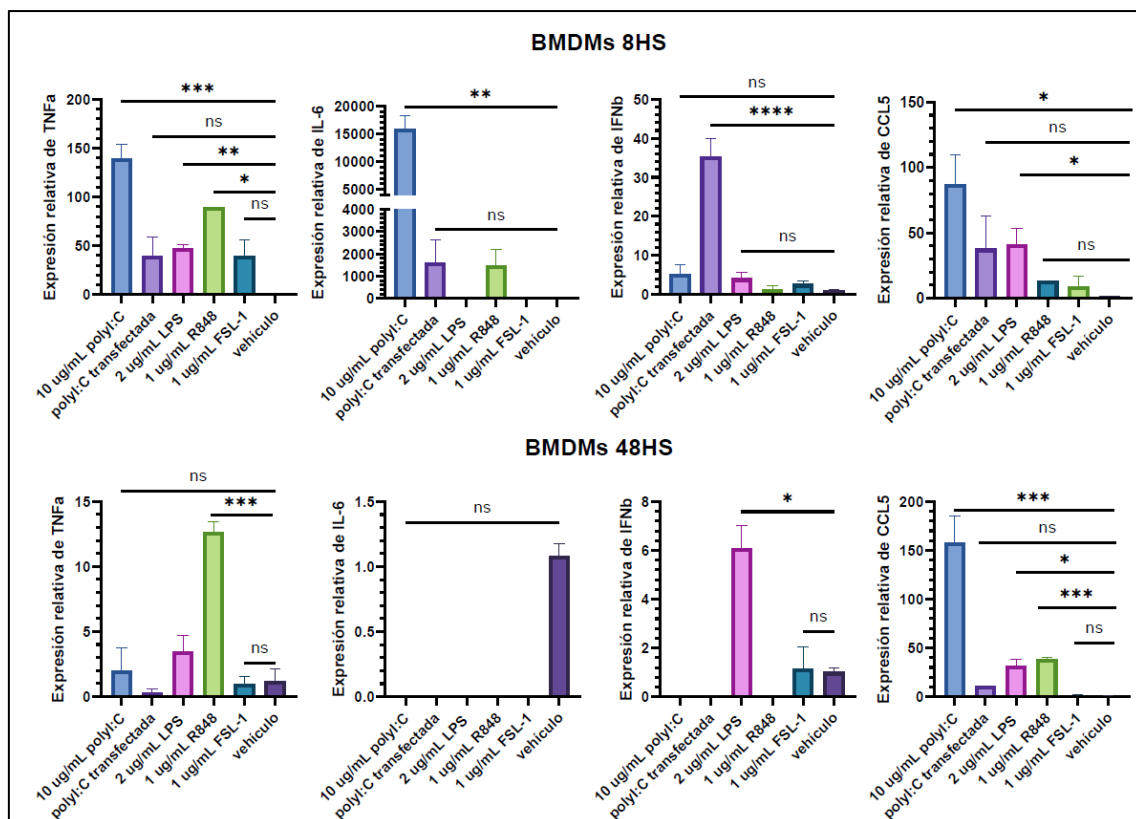


Figura 13. Expresión relativa de IFN- β y de los factores proinflamatorios TNF- α , CCL5 e IL-6 luego de la estimulación de los TLRs (poly(I:C), LPS, R848 y FSL-1) y RLRs (poly(I:C) transfectada) con una duración de 8 y 48 h en macrófagos primarios murinos derivados de médula ósea (BMDMs), determinado por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas biológicas y se utilizó el análisis *ordinary*

one-way ANOVA para determinar la significancia. *; $P \leq 0,05$ **; $P \leq 0,001$, ***; $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

4.4. Infectividad y perfil inflamatorio de BMDMs infectados con arenavirus

Si bien existen modelos murinos con deficiencias genéticas en las vías de señalización del IFN-I susceptibles a infección con ZIKV, ratones inmunocompetentes, como la cepa C57BL/6, son capaces de eliminar tempranamente la infección (61). En particular, la proteína NS5 de ZIKV puede unirse a STAT2 humana dirigiendo su degradación e inhibiendo la vía de IFN-I, pero no es capaz de unirse a STAT2 murino, por lo que los ratones son resistentes a la infección por ZIKV (29). Con estos antecedentes, analizamos la infectividad de ZIKV en BMDMs y, en concordancia con los reportes, no se observó replicación viral.

Por tanto, utilizamos a la cepa atenuada Candid #1 del virus Junín (JUNV-C1) para infectar BMDMs, debido a que su infectividad y la respuesta inmune generada en células murinas ha sido previamente documentada, y a que esta cepa presenta tasas de replicación similares a variantes patogénicas (62). De acuerdo con lo descrito, detectamos elevados niveles de infección de JUNV-C1 en BMDMs tras 48 h (Figura 14). También se ha reportado que la respuesta innata frente a infección por JUNV-C1 es dependiente principalmente de TLR2, resultando en la producción temprana (2 h) de elevados niveles de citoquinas inflamatorias (62). En nuestro caso no observamos inducción de los factores proinflamatorios IL-6, CCL5 y CXCL10, así como tampoco de IFN- β a las 48 h post-infección (Figura 14), conforme a los resultados con el agonista de TLR2 FSL-1. Estos resultados pueden asociarse al intervalo analizado y/o a que JUNV-C1 es capaz de limitar la respuesta inmune innata a través de la actividad de las proteínas Z y NP luego de replicarse en estos macrófagos (62).

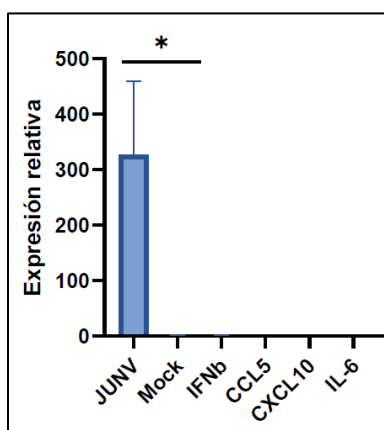


Figura 14. Niveles de infección de JUNV-C1 y de expresión de los factores proinflamatorios IL-6, CCL5 y CXCL10 e IFN- β luego de la infección de BMDMs con JUNV a un MOI de 1 por 48 h, determinado por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas biológicas donde se utilizó unpaired T-test para determinar la significancia. *; $P \leq 0,05$ calculado con GraphPad.

4.5. Silenciamiento de SIRPA mediante ARN de interferencia

Para silenciar la expresión de SIRPA (*knockdown*) en la línea celular A549, utilizamos un RNA interferente corto (siRNA) que reconoce el exón 6 del transcrito maduro. Mediante RT-qPCR confirmamos la disminución de los niveles de expresión de SIRPA relativa al gen *housekeeping* GAPDH a las 48 h post-transfección del siRNA (Figura 15). Esta estrategia nos permitió analizar la función de SIRPA durante infecciones virales, así como la complementación funcional del péptido sintético ITIM-1 en células SIRPA *knockdown*.

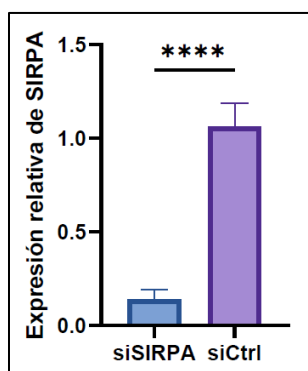


Figura 15. *Knockdown* de SIRPA. Se silenció la expresión de SIRPA en células A549 por 48 h y se analizó su expresión mediante RT-qPCR respecto a un siCtrl. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 4 experimentos independientes donde de utilizó unpaired T-test para determinar la significancia. *, $P \leq 0,05$ **, $P \leq 0,001$, ***, $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

4.6. SIRPA restringe la entrada de flavivirus a células humanas

Similar a su rol en la fagocitosis, nuestro grupo demostró que SIRPA restringe la internalización de virus envueltos que utilizan vías endocíticas (63). En base a esto, analizamos los niveles de infección de ZIKV y DENV a las 48 h en células A549 SIRPA *knockdown* mediante RT-qPCR. En la Figura 16 se observa que el silenciamiento de SIRPA aumenta los niveles de ARN viral tanto para ZIKV como para DENV, describiendo por primera vez que SIRPA también limita la infección por DENV.

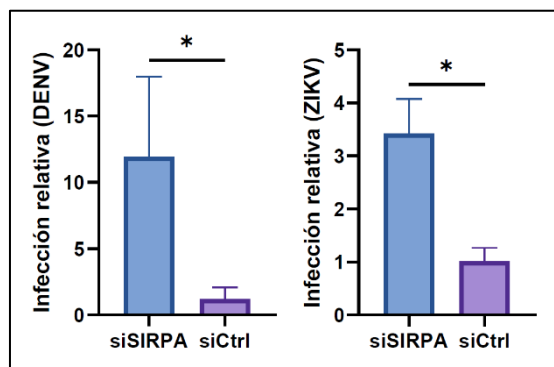


Figura 16. Infección de células A549 SIRPA *knockdown* con ZIKV y DENV durante 48 h. Se cuantificó el ARN viral por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales donde de utilizó el

análisis unpaired T-test para determinar la significancia. *; $P \leq 0,05$ calculado con GraphPad.

4.7. Rol de SIRPA en la producción de factores proinflamatorios e IFN-I tras la estimulación de RLRs en células A549

Como fue mencionado anteriormente, nuestra hipótesis es que SIRPA también contribuiría al mantenimiento de la homeostasis celular regulando negativamente la señalización inmune durante infecciones virales. En base a los resultados de las estimulaciones de los TLRs y RLRs, el análisis del rol de SIRPA en la respuesta inmune innata en células A549 se centró en la estimulación de RLRs mediante transfección de poly(I:C), molécula mimética de ARNdH generada durante la replicación de los flavivirus ZIKV y DENV. Con este objetivo, se transfectaron células A549 SIRPA *knockdown* con poly(I:C) y se analizaron los niveles de transcripción de factores proinflamatorios e IFN- β respecto a células control (siCtrl). En la Figura 17 se muestra que las células SIRPA *knockdown* expresan niveles significativamente mayores de TNF- α , CCL5 y CXCL10 respecto a células siCtrl 48 h post-transfección, mientras que no se observaron diferencias para el IFN- β . Estos resultados indicarían que SIRPA modula la producción de factores inflamatorios e IFN-I mediada por los receptores citosólicos RLRs.

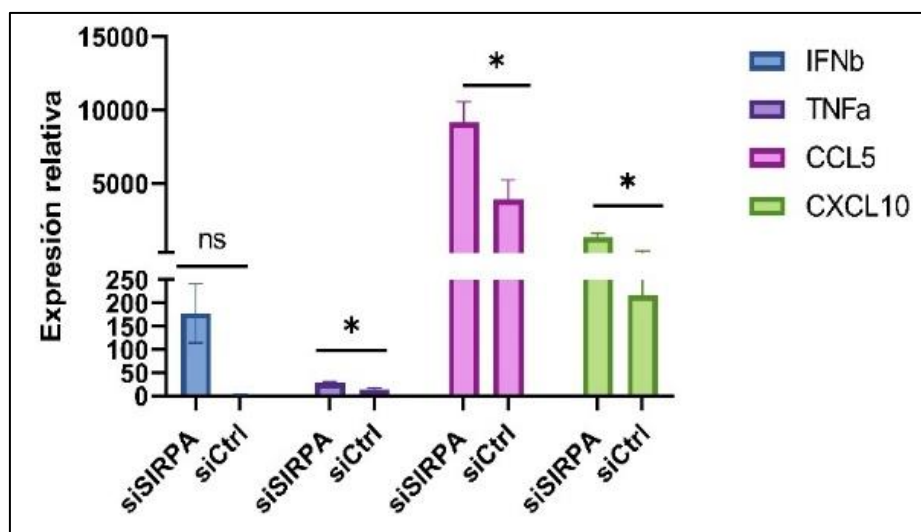


Figura 17. Células A549 SIRPA *knockdown* se transfectaron con poly(I:C) durante 48 h y se cuantificó la expresión de TNF- α , CCL5 y CXCL10, e IFN- β por RT-qPCR. Se muestra la DE \pm promedio de 2 réplicas experimentales con el análisis unpaired T-test. *; $P \leq 0,05$ calculado con GraphPad.

En condiciones basales, los niveles de fosforilación de SIRPA, así como de asociación con las fosfatasa SHP-1/2, son mínimos. No obstante, la estimulación de los TLRs 3 y 4 induce la fosforilación de tirosina de sus ITIMs, activando a las fosfatasa SHP-1/2 e iniciando cascadas de señalización inhibitorias (66, 67). Se ha demostrado que SHP-2 regula negativamente la producción de factores proinflamatorios e IFN-I mediada por TLR4 y TLR3, uniéndose

directamente a la quinasa TBK1 y suprimiendo su señalización mediante un mecanismo independiente de su actividad fosfatasa (65). Asimismo, se ha reportado que células *knockdown* SIRPA presentan mayores niveles de actividad de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B luego de la estimulación de TLR4, expresando niveles más elevados de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 (9). Debido a que la activación de SIRPA recluta a SHP-2 iniciando una cascada de señalización que regula negativamente la producción de factores proinflamatorios mediada por TLRs, un efecto similar podría esperarse frente a la estimulación de los RLRs. De hecho, la quinasa TBK1 participa también de las vías de señalización de los RLRs fosforilando y activando al factor de transcripción IRF3 (65). De tal forma, el aumento de la expresión de factores proinflamatorios en células SIRPA *knockdown* transfectadas con poly(I:C), podría asociarse a la señalización iniciada por SHP-2.

4.8. Rol de SIRPA en la producción de factores proinflamatorios e IFN-I tras la infección con ZIKV en células A549

Para determinar si SIRPA desempeña un papel en la señalización inmune mediada por ZIKV, se infectaron células A549 SIRPA *knockdown* con ZIKV a un MOI de 1 y se analizaron los niveles de transcripción de factores proinflamatorios e IFN- β . Como se observa en la Figura 18, no hay diferencias significativas en la expresión de TNF- α e IFN- β , aunque existe una tendencia a una mayor expresión de estas citoquinas en células SIRPA *knockdown*. Sin embargo, estas células expresan niveles significativamente menores de CCL5 y CXCL10 respecto a células siCtrl.

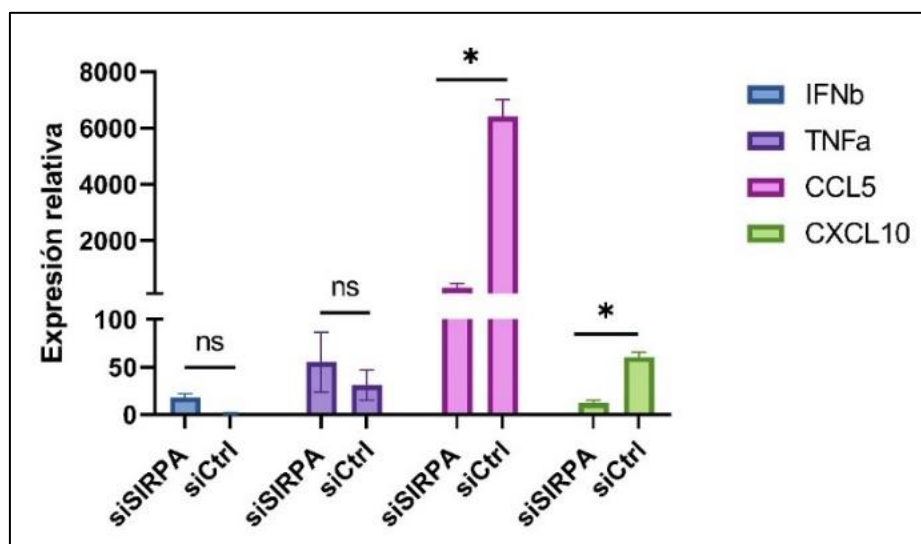


Figura 18. Células SIRPA *knockdown* se infectaron con ZIKV (MOI=1) por 48 h y se cuantificó la expresión de TNF- α , CCL5, CXCL10 e IFN- β por RT-qPCR. Se muestra la DE \pm promedio de 2 réplicas experimentales donde se utilizó el análisis unpaired T-test para determinar la significancia. *; $P \leq 0,05$ calculado con GraphPad.

Dado el rol inhibitorio de SIRPA en la entrada viral y la señalización mediada por RLRs, podría esperarse que las células SIRPA *knockdown* expresen niveles más elevados de citoquinas al infectarlas con ZIKV. De hecho, el silenciamiento de SIRPA aumenta los niveles de infección viral y en consecuencia la presencia de PAMPs virales a nivel celular, favoreciendo la activación de la respuesta inmune y la producción de factores inflamatorios e IFN-I. Si bien demostramos que el silenciamiento de SIRPA aumenta los niveles de IFN- β y TNF- α respecto a células siCtrl en el contexto de infección por ZIKV, curiosamente observamos lo opuesto para las quimioquinas CCL5 y CXCL10 (Figura 18). En este sentido, Plociennikowska y cols. describieron una interferencia negativa entre la señalización de TLR3 y los RLRs que contribuye a la supresión de la respuesta de IFN- β inducida por ZIKV (66), y que a su vez podría causar la expresión reducida de las quimioquinas CCL5 y CXCL10. Durante la infección por ZIKV, la señalización de TLR3 contribuye a la producción de factores proinflamatorios, principalmente las citoquinas IL-6 y TNF- α , mientras que la vía de IFN- β es activada principalmente por la estimulación de RLRs (66). Estas citoquinas proinflamatorias, en particular IL-6, podrían inducir la expresión de SOCS3, una proteína supresora de la señalización de IFN-I (67). De esta manera, la producción de citoquinas proinflamatorias mediada por TLR3, cuya expresión es mayor en células SIRPA *knockdown*, podría contribuir a una mayor inducción de SOCS3 (66), llevándolo así a la reducción de la expresión de las quimioquinas CCL5 y CXCL10 inducidas por los RLRs observada aquí. Sin embargo, para comprobarlo es necesario determinar experimentalmente cual es la fuente principal de citoquinas proinflamatorias frente a la infección por ZIKV.

4.9. Rol de SIRPA en la producción de factores proinflamatorios e IFN-I tras la estimulación con agonistas de TLRs y RLRs en células murinas primarias

Con el objetivo de expandir resultados preliminares de nuestro grupo utilizando macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) de ratones Sirpa KO y WT estimulados con agonistas de TLRs, realizamos estimulaciones de BMDMs de ambos genotipos con poly(I:C) (TLR3 y RLRs), LPS (TLR4), R848 (TLR7/TLR8) y FSL-1 (TLR2/TLR6) por 8 h, para analizar la producción de factores proinflamatorios e IFN- β . Como se aprecia en la Figura 19, las diferentes estimulaciones resultan en la expresión a distintos niveles de factores proinflamatorios e IFN- β , los cuales difieren entre células WT y Sirpa KO. En primer lugar, el tratamiento con poly(I:C) resultó en una inducción mayor de TNF- α y menor de CCL5 en células Sirpa KO, mientras que no detectamos expresión de IFN- β (Figura 19). En la transfección de poly(I:C) detectamos niveles más elevados IFN- β en BMDMs Sirpa KO, aunque esta diferencia no fue significativa, mientras que CCL5 fue producido en menor proporción en células Sirpa KO (Figura 19). Finalmente, el tratamiento con LPS y FSL-1 no evidenció diferencias significativas para la expresión de TNF- α , mientras que observamos una mayor expresión de CCL5 en BMDMs WT, siendo esta diferencia significativa para el tratamiento con LPS (Figura 19).

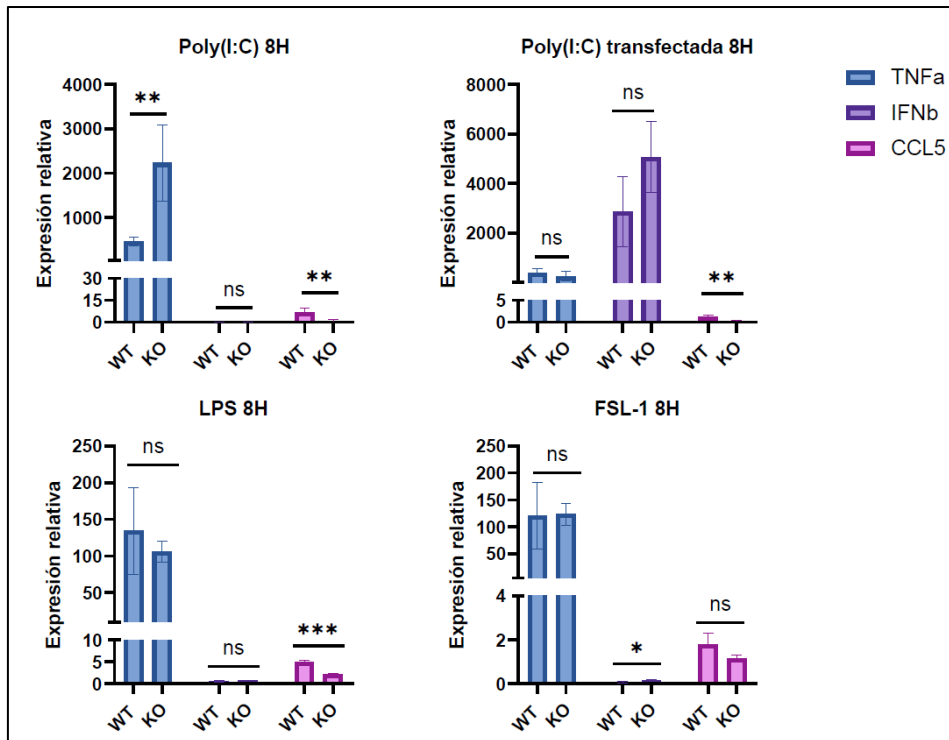


Figura 19. Expresión relativa de IFN- β y de los factores proinflamatorios TNF- α y CCL5 luego de la estimulación de los TLRs (poly(I:C) a TLR3, LPS a TLR4 y FSL-1 a TLR2/6) y RLRs (poly(I:C) transfectada) con una duración de 8 h en macrófagos primarios murinos derivados de médula ósea (BMDMs) de ratones Sirpa KO y WT, determinado por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas biológicas donde se utilizó el análisis unpaired T-test para determinar la significancia. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,001$; ***, $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

En términos generales, las células Sirpa KO presentan mayor inducción de TNF- α cuando se estimula TLR3, vía de señalización dependiente de TRIF que activa NF- κ B e IRF-3. Por otra parte, no se evidencian diferencias significativas de TNF- α entre las células Sirpa KO y WT estimuladas con agonistas de TLRs dependientes de MyD88 (TLR2/4/6). TLR4 es el único receptor capaz de señalizar a través de ambas proteínas adaptadoras TRIF y MyD88; por tanto, la tendencia de mayor inducción de TNF- α en células Sirpa KO tratadas con LPS puede asociarse a las vías de señalización dependientes de TRIF. En cuanto a la expresión de IFN- β en BMDMs, solamente observamos niveles elevados al estimular los RLRs, los cuales fueron mayores en células Sirpa KO (Figura 19). Estos resultados sugieren que SIRPA también modularía negativamente señalización mediada por los RLRs, que involucra la activación de MAVS y de los factores de transcripción IRF3 e IRF7 y NF- κ B (14). Por último, las mayores diferencias se aprecian cuando se estimulan los TLRs que involucran a las proteínas TRIF/TRAM (TLR3/4). Así, la contribución de SIRPA a la regulación de la respuesta inmune innata sería dependiente de la vía de señalización activada. En base a nuestros resultados, proponemos que SIRPA participaría en la regulación de la respuesta inmune dependiente de TRIF, y no en las vías de señalización dependientes de MyD88, en macrófagos murinos.

4.10. Péptidos sintéticos derivados de SIRPA: localización subcelular y citotoxicidad

La fosforilación de tirosina de los ITIMs de SIRPA, inducida por diversos estímulos, es necesaria para la interacción con las fosfatasas SHPs y para su función negativa en distintos procesos celulares (68). Para analizar la contribución de cada ITIM en la actividad antiviral e inmunomoduladora de SIRPA, diseñamos péptidos sintéticos representativos de ambos ITIMs. En este trabajo evaluamos el potencial de un péptido derivado del ITIM-1, denominado ITIM-1 WT, el cual fue sintetizado por el método de síntesis en fase sólida en el laboratorio de Ingeniería de péptidos y farmacoterapia en el INRS (Laval, Canadá), con modificaciones para aumentar su estabilidad y flexibilidad, y fusionado a la secuencia GRKKRRQRRR derivada de la proteína Tat del virus HIV-1, perteneciente a la familia de los *self-penetrating peptides*, para facilitar su internalización celular. Además, se sintetizó una versión del péptido conjugado al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), denominado ITIM-1 FITC, con el objetivo de determinar su localización subcelular una vez que es internalizado. El fluorocromo fue conjugado en el extremo N-terminal del péptido luego del motivo Ahx, para prevenir interacciones no específicas con la secuencia peptídica (Figuras 25 y 26, Anexo 2).

Previamente a evaluar la actividad biológica (considerándose como actividad biológica el efecto antiviral y/o inmunomodulador) del péptido ITIM-1 WT, analizamos la localización subcelular del péptido ITIM-1 FITC en células A549 por microscopía de epifluorescencia, utilizando distintas concentraciones (10 μ M, 100 μ M y 1 mM) y tiempos de incubación (1, 6 y 24 h). Cuando utilizamos una concentración de 10 μ M, los péptidos fueron apenas evidenciables luego de 1 h de incubación; cuando aumentamos la concentración a 100 μ M, los péptidos se visualizaron claramente tras 1 h localizándose mayoritariamente en la periferia celular, similar al posicionamiento de SIRPA en la membrana plasmática. Sin embargo, a las 6 y 24 h los péptidos no se detectaron a 10 y 100 μ M. También se evaluaron los diferentes tiempos de incubación (1, 6 y 24 horas) para la concentración de 1 mM, la cual es demasiado elevada para un tratamiento factible en comparación con otros estudios que emplean péptidos sintéticos terapéuticos (69), pero tal como se observa en la Figura 20 permite la clara visualización de la acumulación de los péptidos en la periferia. Estos resultados sugieren que una concentración de 100 μ M con un tiempo de incubación de 1 h es óptima para que los péptidos sean internalizados, por lo que en ensayos posteriores utilizamos esta concentración y duración del tratamiento. Para la concentración seleccionada del péptido ITIM-1(100 μ M), también evaluamos la viabilidad celular para todos los intervalos empleando azul de Tripán y el contador de células Countess 3 Automated Cell Counter (Thermo), demostrando que el tratamiento no es citotóxico (Tabla 4).

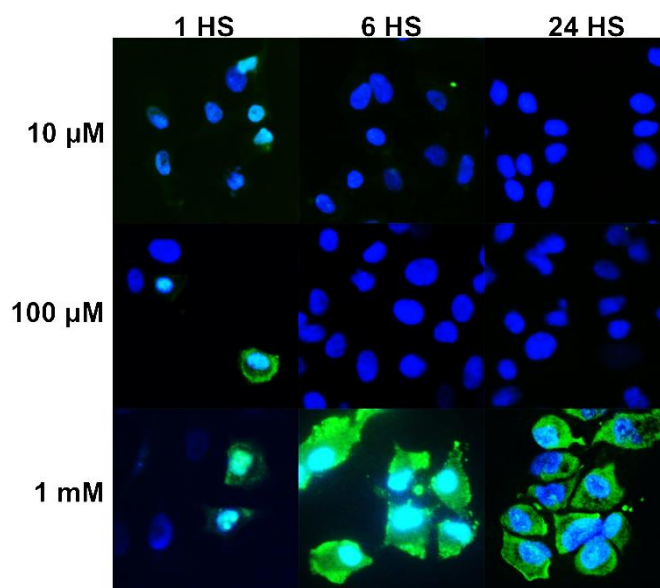


Figura 20. Localización subcelular del péptido ITIM-1 FITC. Imágenes representativas de células A549 tratadas con el péptido a diferentes concentraciones e intervalos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y las imágenes fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia (40X).

Tabla 4. Viabilidad de células A549 luego del tratamiento con el péptido ITIM-1 (100 μ M)

Duración del tratamiento	1 h	6 h	24 h	Control (sin tratamiento)
Porcentaje de células viables	95%	98%	93%	96%

4.11. Tratamiento con péptido ITIM-1 y su efecto en la señalización a través de los RLRs

Una vez seleccionada la duración y concentración del pretratamiento, investigamos el rol antiviral e inmunomodulador del péptido ITIM-1. Como mostramos anteriormente, células SIRPA *knockdown* transfectadas con poly(I:C) expresan niveles más elevados de factores proinflamatorios (Figura 17). Para analizar la actividad de ITIM-1 WT, realizamos un ensayo de complementación de función en células A549 SIRPA *knockdown* tratadas con el péptido según las condiciones descritas y transfectadas con poly(I:C) por 48 h. Como se observa en la Figura 21, no observamos diferencias significativas en la expresión de factores proinflamatorios e IFN- β en células A549 SIRPA *knockdown* incubadas con el péptido ITIM-1 o un vehículo (agua), sugiriendo que este péptido no es capaz de mediar la señalización inhibitoria de SIRPA.

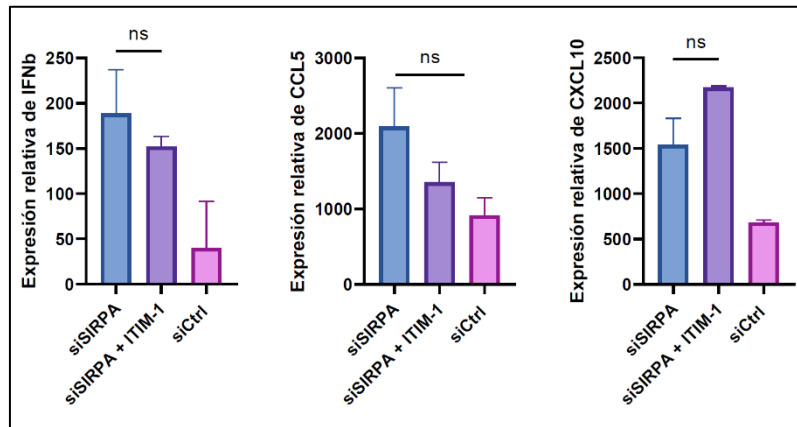


Figura 21. Células SIRPA *knockdown* fueron tratadas con ITIM-1 (100 μ M, 1 hora) y transfectadas con poly(I:C) durante 48 h para cuantificar la expresión de IFN- β , CCL5 y CXCL10, e por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales donde se utilizó el análisis unpaired T-test para determinar la significancia. *; $P \leq 0,05$ calculado con GraphPad.

4.12. Tratamiento con péptido ITIM-1 y su efecto en la restricción viral y señalización inmune frente a la infección con ZIKV

Para determinar la capacidad antiviral del péptido ITIM-1 WT (100 μ M, 1 hora), se llevó a cabo un ensayo de complementación de función en células A549 SIRPA *knockdown* tratadas con el péptido y posteriormente infectadas con ZIKV a un MOI de 1 durante 48 h. Como se muestra en la Figura 22, el tratamiento de células SIRPA *knockdown* con ITIM-1 WT restaura parcialmente la función antiviral de SIRPA, evidenciada por una disminución significativa en los niveles de infección respecto a células SIRPA *knockdown* no tratadas. Adicionalmente, realizamos este experimento con DENV (MOI=0.5) observando una restauración total de la función de SIRPA (Figura 22).

En cuanto a la señalización inmune (Figura 23), no se observaron diferencias significativas en la expresión de los factores proinflamatorios e IFN- β entre células SIRPA *knockdown* en presencia/ausencia de ITIM-1 WT, con la excepción de CCL5. Previamente se demostró que la expresión de un péptido que abarca el primer residuo de tirosina del ITIM-1 de SIRPA fue capaz de suprimir la señalización de NF- κ B mediada por TLR4 (68). Sin embargo, en este caso nuestro péptido ITIM-1 no parece tener un efecto en la señalización inmune aquí evaluada. En definitiva, se sugiere que este péptido no es capaz de modular la señalización inhibitoria de SIRPA, tal como se demostró para la estimulación de los RLRs.

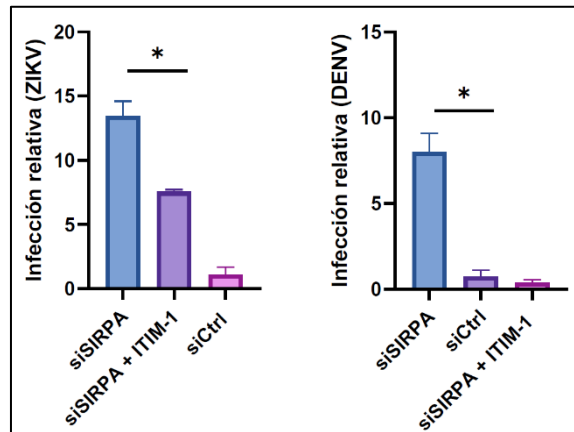


Figura 22. Células SIRPA *knockdown* fueron tratadas con ITIM-1 WT (100 μ M, 1 h) y se infectaron con ZIKV a un MOI de 1 y DENV a un MOI de 0,5 durante 48 h para cuantificar niveles de ARN viral por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales donde se utilizó el análisis unpaired T-test para determinar la significancia. *, $P \leq 0,05$ **, $P \leq 0,001$, ***; $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

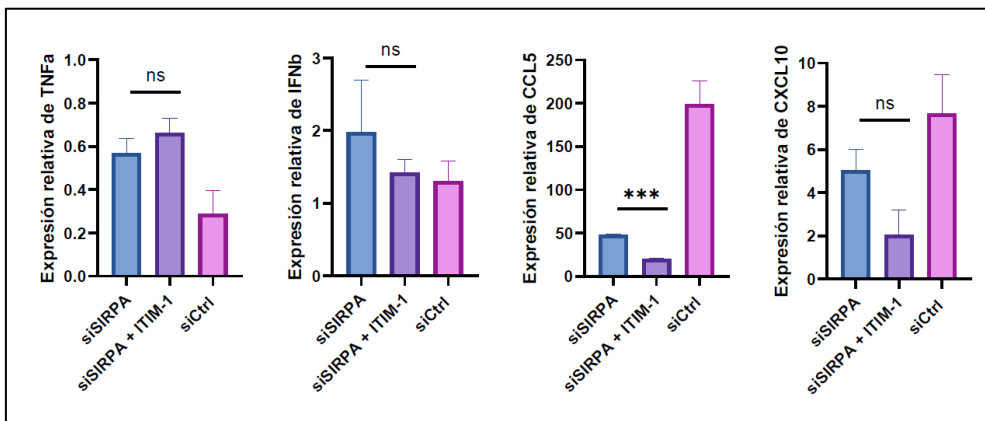


Figura 23. Células SIRPA *knockdown* fueron tratadas con ITIM-1 WT (100 μ M, 1 h) y se infectaron con ZIKV a un MOI de 1 durante 48 h para cuantificar niveles de ARN viral y de expresión de TNF- α , CCL5, CXCL10, e IFN- β por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas experimentales donde se utilizó el análisis unpaired T-test para determinar la significancia. *, $P \leq 0,05$ **, $P \leq 0,001$, ***; $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

4.13. Determinación de expresión de SIRPA en macrófagos murinos primarios

Para analizar la actividad del péptido ITIM-1 WT *ex vivo*, aislamos BMDMs de ratones Sirpa KO y WT y examinamos niveles de replicación viral y producción de citoquinas con distintos estímulos. Para validar la ausencia de SIRPA, se analizó su expresión en BMDMs WT y Sirpa KO mediante *western blot* utilizando un anticuerpo anti-SIRPA que reconoce el dominio citoplasmático (#13379; Cell Signaling Technologies (CST)). En la Figura 24 se observa la expresión de SIRPA en los BMDMs WT, con una banda aproximada de 140 kDa, mientras que en las células provenientes de ratones Sirpa KO no se detectó esta banda.

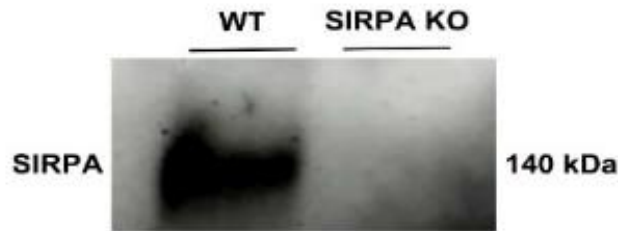


Figura 24. Western Blot de SIRPA en BMDMs de ratones WT (C57BL/6) y Sirpa KO (Sirpa^{tm1Ynliu/J}) utilizando un anticuerpo anti-SIRPA (CST).

4.14. Tratamiento con péptido ITIM-1 WT reduce los niveles de infección con JUNV-C1 en macrófagos primarios murinos

Para analizar la capacidad antiviral del péptido ITIM-1 WT *ex vivo*, se realizó un ensayo de complementación en BMDMs WT y Sirpa KO infectados con JUNV-C1 por 48 h. En la Figura 25 se observa que las células Sirpa KO muestran niveles de infección significativamente mayores que los BMDMs WT, confirmando observaciones previas sobre la actividad de SIRPA en la infección por JUNV-C1 *ex vivo* (63). Cuando realizamos el pretratamiento de BMDMs Sirpa KO con ITIM-1 WT previo a la infección con JUNV-C1 detectamos una disminución significativa de los niveles de infección viral respecto a los BMDMs Sirpa KO, indicando que el péptido es biológicamente activo y que su actividad también restringe la infección de JUNV-C1 (Figura 25).

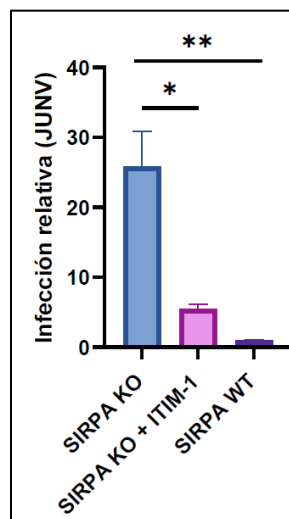


Figura 25. Niveles de ARN viral luego de la infección con JUNV-C1 a un MOI de 1 por 48 h en BMDMs de ratones Sirpa KO tratados con ITIM-1 WT (100 μ M, 1 hora) o sin tratamiento y BMDMs WT. La cuantificación fue realizada mediante RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 réplicas biológicas donde se utilizó el análisis unpaired T-test para determinar la significancia. *, P \leq 0,05; **, P \leq 0,001, ***, P \leq 0,0001 calculado con GraphPad.

5. Conclusiones

En este trabajo examinamos la actividad antiviral de SIRPA frente a virus de relevancia para la salud pública como los Flavivirus y Arenavirus, así como su papel en la señalización inmune ante estas infecciones y frente a moléculas agonistas de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Determinamos que SIRPA actúa como un factor antiviral contra los flavivirus ZIKV, DENV y JUNV-C1, aunque su contribución a la respuesta inmune innata varía según la vía de señalización activada y el tipo celular involucrado.

Dado el rol prominente de SIRPA en el contexto de infecciones virales, diseñamos y sintetizamos un péptido mimético representativo del ITIM-1 (ITIM-1 WT), con el objetivo de evaluar su potencial antiviral e inmunomodulador. Esta estrategia terapéutica ofrece un gran potencial debido a su fácil diseño y síntesis, bajos costos de producción y alta especificidad de acción. Nuestros resultados mostraron que las células SIRPA *knockdown/knockout* tratadas con este péptido presentaron menores niveles de infección viral en comparación con las células sin tratamiento, sugiriendo que ITIM-1 WT es capaz de restaurar parcialmente la actividad antiviral de SIRPA. Sin embargo, el tratamiento con este péptido no resultó en niveles diferenciales de expresión de factores proinflamatorios e IFN-I, destacando la importancia de evaluar la forma fosforilada de ITIM-1 WT, así como los péptidos derivados del ITIM-2.

En suma, este trabajo proporciona información novedosa sobre la biología de SIRPA en el contexto de infecciones virales y su potencial aplicación en el desarrollo de biofármacos antivirales.

Referencias bibliográficas

1. Qu T, Li B, Wang Y. Targeting CD47/SIRP α as a therapeutic strategy, where we are and where we are headed. *Biomark Res.* 2022; 10(1).
2. Reimer E, Stempel M, Chan B, Bley H, Brinkmann MM. Protein tyrosine phosphatase 1B is involved in efficient type I interferon secretion upon viral infection. *J Cell Sci.* 2021; 134(5).
3. Lee LJ, Komarasamy TV, Adnan NAA, James W, RMT Balasubramaniam V. Hide and Seek: The Interplay Between Zika Virus and the Host Immune Response. *Front Immunol.* 2021; 12.
4. Chan B, Gonçalves Magalhães V, Lemmermann NAW, Juranić Lisnić V, Stempel M, Bussey KA, Reimer E, Podlech J, Lienenklaus S, Reddehase MJ, et al. The murine cytomegalovirus M35 protein antagonizes type I IFN induction downstream of pattern recognition receptors by targeting NF- κ B mediated transcription. *PLoS Pathog.* 2017; 13(5).
5. Hertzog J, Dias Junior AG, Rigby RE, Donald CL, Mayer A, Sezgin E, Song C, Jin B, Hublitz P, Eggeling C, et al. Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *Eur J Immunol.* 2018; 48(7): 1120-36.
6. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 2011; 1(6): 519-25.
7. Jack Bruno Plewa. Study of diverse host immune responses to viral and bacterial pathogens. 2023;
8. Hoden B, DeRubeis D, Martinez-Moczygemba M, Ramos KS, Zhang D. Understanding the role of Toll-like receptors in lung cancer immunity and immunotherapy. *Front Immunol.* 2022; 13.
9. Kong XN, Yan HX, Chen L, Dong LW, Yang W, Liu Q, Yu LX, Huang DD, Liu SQ, Liu H, et al. LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein α contributes to innate immune activation in macrophages. *Journal of Experimental Medicine.* 2007; 204(11): 2719-31.
10. Hoe Lau W, Ge Zhu X, Wei Ting Ho S, Chun Chang S, Ling Ding J. Combinatorial treatment with polyI:C and anti-IL6 enhances apoptosis and suppresses metastasis of lung cancer cells. 2017; 8(20): 32884-904. Disponible desde: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15862>

11. Knez Š, Narat M, Ogorevc J. Differential Gene Expression Induced by Different TLR Agonists in A549 Lung Epithelial Cells Is Modulated by CRISPR Activation of TLR10. *Biomolecules*. 2023; 13(1).
12. Tissari J, Sirén J, Meri S, Julkunen I, Matikainen S. IFN- α Enhances TLR3-Mediated Antiviral Cytokine Expression in Human Endothelial and Epithelial Cells by Up-Regulating TLR3 Expression. *The Journal of Immunology*. 2005; 174(7): 4289-94.
13. Melkamu T, O'grady SM. Toll-like receptor interactions and their contribution to airway inflammation. 2010;
14. Bowen JR, Zimmerman MG, Suthar MS. Taking the defensive: Immune control of Zika virus infection. *Virus Res*. 2018; 254: 21-6.
15. Hayes MW, Carrion R, Nunneley J, Medvedev AE, Salvato MS, Lukashevich IS. Pathogenic Old World Arenaviruses Inhibit TLR2/Mal-Dependent Proinflammatory Cytokines In Vitro . *J Virol*. 2012; 86(13): 7216-26.
16. Abo-zeid Y, Urbanowicz RA, Thomson BJ, Irving WL, Tarr AW, Garnett MC. Enhanced nanoparticle uptake into virus infected cells: Could nanoparticles be useful in antiviral therapy? *Int J Pharm*. 2018; 547(1-2): 572-81.
17. Surnar B, Kamran MZ, Shah AS, Basu U, Kolishetti N, Deo S, Jayaweera DT, Daunert S, Dhar S. Orally Administrable Therapeutic Synthetic Nanoparticle for Zika Virus. *ACS Nano*. 2019; 13(10): 11034-48.
18. Ortega-Berlanga B, Hernández-Adame L, del Angel-Olarte C, Aguilar F, Rosales-Mendoza S, Palestino G. Optical and biological evaluation of upconverting Gd₂O₃:Tb³⁺/Er³⁺ particles as microcarriers of a Zika virus antigenic peptide. *Chemical Engineering Journal*. 2020; 385.
19. Huang S, Gu J, Ye J, Fang B, Wan S, Wang C, Ashraf U, Li Q, Wang X, Shao L, et al. Benzoxazine monomer derived carbon dots as a broad-spectrum agent to block viral infectivity. *J Colloid Interface Sci*. 2019; 542: 198-206.
20. Uno N, Ross TM. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7(1).
21. de Sales-Neto JM, Madruga Carvalho DC, Arruda Magalhães DW, Araujo Medeiros AB, Soares MM, Rodrigues-Mascarenhas S. Zika virus: Antiviral immune response, inflammation, and cardiotonic steroids as antiviral agents. *Int Immunopharmacol*. 2024; 127.
22. Hardy JM, Newton ND, Modhiran N, P Scott CA, Venugopal H, Vet LJ, Young PR, Hall RA, Hobson-Peters J, Coulibaly F, et al. A unified route for flavivirus structures uncovers

- essential pocket factors conserved across pathogenic viruses. [citado 21 de julio de 2024]; Disponible desde: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22773-1>
23. Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol.* 2014; 426(6): 1148-60.
 24. Rodriguez-Morales AJ, Montenegro-Idrogo JJ, Celis-Salinas JC, Angerami R, Villamil-Gómez WE, Sarute N, Orduna T, Perret C, Forero-Peña DA, Rodriguez-Enciso HD, et al. Unraveling the unparalleled 2024 epidemic of Dengue in the Americas. *Rev Chilena Infectol.* 2024; 41(3): 421-8.
 25. Kallás EG, Cintra MAT, Moreira JA, Patiño EG, Braga PE, Tenório JCV, Infante V, Palacios R, de Lacerda MVG, Batista Pereira D, et al. Live, Attenuated, Tetravalent Butantan–Dengue Vaccine in Children and Adults. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2024 [citado 21 de julio de 2024]; 390(5): 397-408. Disponible desde: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2301790>
 26. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature Microbiology* 2020 5:6 [Internet]. 2020 [citado 22 de julio de 2024]; 5(6): 796-812. Disponible desde: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0714-0>
 27. Global Arbovirus Initiative [Internet]. [citado 22 de julio de 2024]; Disponible desde: <https://www.who.int/initiatives/global-arbovirus-initiative>
 28. Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, Brandão LAC. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution.* 2019; 69: 22-9.
 29. Shaily S, Upadhy A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Rev Med Virol.* 2019; 29(4).
 30. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16(3): 125-42.
 31. Maus A, Strait L, Zhu D. Nanoparticles as delivery vehicles for antiviral therapeutic drugs. *Engineered Regeneration.* 2021; 2: 31-46.
 32. Esser-Nobis K, Aarreberg LD, Roby JA, Fairgrieve MR, Green R, Gale M. Comparative Analysis of African and Asian Lineage-Derived Zika Virus Strains Reveals Differences in Activation of and Sensitivity to Antiviral Innate Immunity. *J Virol.* 2019; 93(13).
 33. Fedeli C, Moreno H, Kunz S. Novel Insights into Cell Entry of Emerging Human Pathogenic Arenaviruses. *J Mol Biol.* 2018; 430(13): 1839-52.
 34. Sarute N, Ross SR. New World Arenavirus Biology. *Annu Rev Virol* [Internet]. 2017 [citado 22 de julio de 2024]; 4(2017): 141-58. Disponible desde: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-virology-101416-042001>

35. Bonthius DJ. Lymphocytic Choriomeningitis Virus: An Underrecognized Cause of Neurologic Disease in the Fetus, Child, and Adult. *Semin Pediatr Neurol*. 2012; 19(3): 89-95.
36. Safronetz D, Feldmann H, Falzarano D. Arenaviruses and filoviruses. *Medical Microbiology* [Internet]. 2012 [citado 22 de julio de 2024]; 546-58. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702040894000688>
37. Zhang Y, Li L, Liu X, Dong S, Wang W, Huo T, Guo Y, Rao Z, Yang C. Crystal structure of Junin virus nucleoprotein. *J Gen Virol* [Internet]. 2013 [citado 22 de julio de 2024]; 94(10): 2175-83. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23884367/>
38. Huang C, Kolokoltsova OA, Yun NE, Seregin A V., Poussard AL, Walker AG, Brasier AR, Zhao Y, Tian B, de la Torre JC, et al. Junín virus infection activates the type I interferon pathway in a RIG-I-dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(5).
39. Fernandes-Santos C, de Azeredo EL. Innate Immune Response to Dengue Virus: Toll-like Receptors and Antiviral Response. *Viruses*. 2022; 14(992).
40. Gorshkov K, Shiryaev SA, Fertel S, Lin YW, Huang CT, Pinto A, Farhy C, Strongin AY, Zheng W, Terskikh A V. Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies. *Front Microbiol*. 2019; 9(3525).
41. Maucourant C, Queiroz GAN, Samri A, Grassi MFR, Yssel H, Vieillard V. Zika virus in the eye of the cytokine storm. *Eur Cytokine Netw*. 2019; 30(3): 74-81.
42. Feng Y, Huang C, Wang Y, Chen J. SIRP α : A key player in innate immunity. *Eur J Immunol*. 2023; 53(11).
43. Barclay AN, Van Den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: Structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32: 25-50.
44. Narla RK, Modi H, Bauer D, Abbasian M, Leisten J, Piccotti JR, Kopytek S, Eckelman BP, Deveraux Q, Timmer J, et al. Modulation of CD47-SIRP α innate immune checkpoint axis with Fc-function detuned anti-CD47 therapeutic antibody. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2022; 71(2): 473-89.
45. Shi L, Kidder K, Bian Z, Kuon S, Chiang T, Ouellette C, Liu Y. SIRP α sequesters SHP-2 to promote IL-4 and IL-13 signaling and the alternative activation of macrophages. *Sci Signal* [Internet]. 2021; 14(702). Disponible desde: <https://doi.org/10.1126/scisignal.abb3966>
46. Wang D, Lin Y, Xu F, Zhang H, Zhu X, Liu Z, Hu Y, Dong G, Sun B, Yu Y, et al. SIRP α maintains macrophage homeostasis by interacting with PTK2B kinase in *Mycobacterium*

- tuberculosis infection and through autophagy and necroptosis. *JSES Open Access* [Internet]. 2017; 1: 139-40. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j>.
47. Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, Wang X, Wang R, Fu C. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7(1).
 48. Lalezari JP, Henry K, O'hearn M, Montaner JSG, Piliero PJ, Walmsley S, Cohen C, Kuritzkes DR, Eron JJ, Chung J, et al. Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor, for Drug-Resistant HIV Infection in North and South America. *n engl j med* [Internet]. 2003; 348(22): 2175-85. Disponible desde: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035026>
 49. Mahendran ASK, Lim YS, Fang CM, Loh HS, Le CF. The Potential of Antiviral Peptides as COVID-19 Therapeutics. *Front Pharmacol*. 2020; 11.
 50. Lozano Jiménez YY, Sánchez Mora RM, Giraldo Quintero SE. Potenciales estrategias terapéuticas basadas en péptidos para mitigar la infección por SARS-CoV-2. *Nova*. 2020; 18(35): 61-6.
 51. Vilas Boas LCP, Campos ML, Berlanda RLA, de Carvalho Neves N, Franco OL. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76(18): 3525-42.
 52. Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human Lung - Role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PLoS One*. 2011; 6(7).
 53. Lu X, Luo L, Ji X, Li Q, Bao J, Song Y. Rosiglitazone inhibits lipopolysaccharide-induced A549 cell apoptosis and inflammation. *Int J Clin Exp Med*. 2018; 11(3): 1855-63.
 54. Wang R, Wang W, Li A, Wang Y, Jin J, Huang Z, Huang G. Lipopolysaccharide enhances DNA-induced IFN- β expression and autophagy by upregulating cGAS expression in A549 cells. *Exp Ther Med*. 2019; 18(5): 4157-64.
 55. Lachová V, Škorvanová L, Svetlíková D, Turianová L, Kostrábová A, Betáková T. Comparison of transcriptional profiles of interferons, CXCL10 and RIG-1 in influenza infected A549 cells stimulated with exogenous interferons. *Acta Virol*. 2017; 61(2): 183-90.
 56. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2013 [citado 28 de julio de 2024]; 17(12): 1439-60. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24090198/>
 57. Nazmi A, Dutta K, Hazra B, Basu A. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. *Virus Res* [Internet]. 2014 [citado 28 de julio de 2024]; 185: 32-40. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24657789/>

58. Lozhkov AA, Plotnikova MA, Egorova MA, Baranovskaya IL, Elpaeva EA, Klotchenko SA, Vasin A V. Simultaneous Detection of RIG-1, MDA5, and IFIT-1 Expression Is a Convenient Tool for Evaluation of the Interferon-Mediated Response. *Viruses* [Internet]. 2022 [citado 28 de julio de 2024]; 14(10). Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36298646/>
59. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2008 [citado 28 de julio de 2024]; 1143: 1-20. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19076341/>
60. Saheb Sharif-Askari N, Saheb Sharif-Askari F, Mdkhana B, Al Heialy S, Alsafar HS, Hamoudi R, Hamid Q, Halwani R. Enhanced expression of immune checkpoint receptors during SARS-CoV-2 viral infection. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021; 20: 109-21.
61. Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, Begley MC, Weger-Lucarelli J, Uccellini MB, Tripathi S, Morrison J, Yount BL, Dinnon KH, et al. An Immunocompetent Mouse Model of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2018 [citado 28 de julio de 2024]; 23(5): 672-685.e6. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29746837/>
62. Cuevas CD, Ross SR. Toll-Like Receptor 2-Mediated Innate Immune Responses against Junín Virus in Mice Lead to Antiviral Adaptive Immune Responses during Systemic Infection and Do Not Affect Viral Replication in the Brain. *J Virol.* 2014; 88(14): 7703-14.
63. Sarute N, Cheng H, Yan Z, Salas-Briceno K, Richner J, Rong L, Ross SR. Signal-regulatory protein alpha is an anti-viral entry factor targeting viruses using endocytic pathways. *PLoS Pathog.* 2021; 17(6).
64. Shi L, Bian Z, Kidder K, Liang H, Liu Y. Non-Lyn Src Family Kinases Activate SIRP α -SHP-1 to Inhibit PI3K-Akt2 and Dampen Proinflammatory Macrophage Polarization. *The Journal of Immunology.* 2021; 207(5): 1419-27.
65. An H, Zhao W, Hou J, Zhang Y, Xie Y, Zheng Y, Xu H, Qian C, Zhou J, Yu Y, et al. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* [Internet]. 2006 [citado 28 de julio de 2024]; 25(6): 919-28. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17157040/>
66. Plociennikowska A, Frankish J, Moraes T, Del Prete D, Kahnt F, Acuna C, Slezak M, Binder M, Bartenschlager R. TLR3 Activation by Zika Virus Stimulates Inflammatory Cytokine Production Which Dampens the Antiviral Response Induced by RIG-I-Like Receptors. *J Virol.* 2021; 95(10).
67. Yakass MB, Franco D, Quaye O. Suppressors of Cytokine Signaling and Protein Inhibitors of Activated Signal Transducer and Activator of Transcriptions As Therapeutic Targets in Flavivirus Infections. *Journal of Interferon and Cytokine Research.* 2020; 40(1): 1-18.

68. Kim EJ, Suk K, Lee WH. SHPS-1 and a synthetic peptide representing its ITIM inhibit the MyD88, but not TRIF, pathway of TLR signaling through activation of SHP and PI3K in THP-1 cells. *Inflamm Res* [Internet]. 2013 [citado 28 de julio de 2024]; 62(4): 377-86. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23314616/>
69. Silva ON, De La Fuente-Núñez C, Haney EF, Fensterseifer ICM, Ribeiro SM, Porto WF, Brown P, Faria-Junior C, Rezende TMB, Moreno SE, et al. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. *Scientific Reports* 2016 6:1 [Internet]. 2016 [citado 28 de julio de 2024]; 6(1): 1-11. Disponible desde: <https://www.nature.com/articles/srep35465>

Anexos

Anexo 1: Protocolos

A. Aislamiento de células progenitoras mieloides de médula ósea murina

1. Separar los miembros posteriores del resto del cuerpo y aislar los huesos de cada miembro.
2. Colocar los huesos en etanol 70% durante 5 minutos (m) y realizar 4 lavados sucesivos de 5 minutos en 1X PBS.
3. Cortar los extremos de los huesos para exponer el canal de la médula ósea.
4. Utilizando una jeringa de 10 mL, enjuagar la médula ósea con DMEM 10%.
5. Transferir la médula ósea disuelta en medio a tubos de 15 mL.
6. Centrifugar a 1200 rpm y 4°C por 10 m.
7. Remover el sobrenadante y resuspender las células en medio para macrófagos (DMEM suplementado con 10% SFB, 2,5% HEPES (Invitrogen), 0,1% piruvato de sodio (Gibco) y 100 µg/mL del factor de estimulación de colonias de macrófagos M-CSF (Stemcell))
8. Incubar 72 h a 37°C.
9. Remover el medio de cultivo y agregar medio para macrófagos fresco.

B. Aislamiento de ARN total de células con el kit GeneJET RNA Purification Kit (Thermo) descrito por el fabricante

1. Remover el medio de los pocillos a lisar.
2. Realizar 1 lavado con 1X PBS
3. Agregar 300 µL de buffer de lisis suplementado con β-mercaptoetanol a cada pocillo a lisar, mezclando con pipeta.
4. Agregar 360 µL de etanol absoluto (96-100%) y mezclar con pipeta.
5. Transferir el volumen total del lisado a la columna de purificación insertada en un tubo colector (2 mL) y centrifugar por 1 minuto a 13500 x g. Descartar el líquido del tubo colector y colocar la columna nuevamente en él.
6. Agregar 700 µL de buffer de lavado 1 a la columna y centrifugar por 1 minuto a 13500 x g. Descartar el líquido del tubo colector y colocar la columna nuevamente en él.
7. Agregar 600 µL de buffer de lavado 2 a la columna y centrifugar por 1 minuto a 13500 x g. Descartar el líquido del tubo colector y colocar la columna nuevamente en él.
8. Agregar 250 µL de buffer de lavado 2 a la columna y centrifugar por 2 minuto a 13500 x g. Descartar el líquido del tubo colector y colocar la columna nuevamente en él.
9. Volver a centrifugar la columna por 1 minuto a velocidad máxima para secarla por completo de buffer de lavado residual.
10. Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL estéril y libre de ARNsas y agregar 50 µL de agua libre de nucleasas sobre la membrana de la columna. Centrifugar por 1 minuto a 13500 x g para eluir el ARN.

11. Descartar la columna de purificación y almacenar el ARN a -80°C hasta su uso.

C. Silenciamiento del gen de SIRPA mediante transfección reversa de ARN pequeño de interferencia (siRNA) descrito por el fabricante del reactivo RNAiMAX (Thermo)

1. Tripsinar células A549 (1 ml/botella 25 cm²) por 5 minutos a 37°C .
2. Diluir las células en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) realizar un recuento en cámara de Neubauer.
3. Ajustar la concentración final para que 500 μL de suspensión celular contengan el número de células que les permita llegar a una confluencia del 50% a las 24 h luego de sembrarlas. Para cada pocillo a transfectar, preparar los complejos siARN-Lipofectamine RNAiMAX de la siguiente manera:
 - a. Diluir 6 pmol de siARN en 25 μL de medio Opti-MEM (Invitrogen) y mezclar con pipeta (tubo A).
 - b. Diluir 1 μL de Lipofectamine RNAiMAX en 25 μL de medio Opti-MEM sin SFB, y mezclar con pipeta (tubo B).
4. Combinar ambos tubos e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Dispensar 50 μL en cada pocillo y sobre el mismo agregar 500 μL de suspensión celular. Mezclar agitando la placa.
6. Incubar las células por 48 h a 37°C en incubadora de CO₂.

D. Transfección de poly(I:C) con el reactivo Lipofectamine 3000 descrito por el fabricante (Thermo)

1. Para cada pocillo a transfectar, preparar complejos poly(I:C)-Lipofectamine 3000 en tubos de 1.5 mL:
 - a. Diluir 10 ng de poly(I:C) en 25 μL de medio Opti-MEM, agregar 1 μL de Lipofectamine 3000 y mezclar con pipeta (tubo A).
 - b. Agregar 1 μL de reactivo p3000 en 25 μL de Opti-MEM sin SFB y mezclar con pipeta (tubo B).
2. Combinar ambos tubos e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Agregar los complejos poly(I:C) -Lipofectamine 3000 a cada pocillo (100 μL).
4. Incubar por 15 minutos adicionales a temperatura ambiente.
5. Adicionar 500 μL de células previamente diluidas en DMEM 10% SFB y mezclar moviendo la placa.
6. Incubar las células por la duración especificada a 37°C en incubadora de CO₂.

E. Determinación de viabilidad celular

1. Tripsinar células A549 (1 mL/botella 25 cm²) por 5 minutos a 37°C .
2. Diluir las células en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB).
3. Realizar una dilución 1:2 de las células y azul de Tripán 0.4%

- Colocar dilución en una cámara Countess e insertarla en el equipo Countess 3 Automated Cell Counter (Thermo)
- Seleccionar "Rapid Capture" y registrar los datos.

F. Fijación y montaje de células para microscopia de epifluorescencia

- Remover el medio de cultivo y lavar las células con 1X PBS a 4°C.
- Fijar las células utilizando formalina 10% durante 15 minutos.
- Lavar las células con 1X PBS helado tres veces.
- Tomar el cubreobjetos con las células fijadas y cubrir con una gota de medio de montaje con DAPI.
- Montar el cubreobjetos sobre un portaobjetos y aplicar presión sobre él por 30 segundos.
- Sellar el perímetro del cubreobjetos y almacenar a 4°C, protegido de la luz.

Anexo 2: Información sobre los péptidos (brindada por el Laboratorio de Ingeniería de péptidos y farmacoterapia, INRS)

A. Secuencias

WT_ITIM-1: Ac-GRKKRRQRRR-Ahx-NDITYADLNLPGKGGKPPAQAAEPNNHTEYASIQT-NH₂

FITC_ITIM-1: FITC-Ahx-GRKKRRQRRR-Ahx-NDITYADLNLPGKGGKPPAQAAEPNNHTEYASIQT-NH₂

B. Estructura química

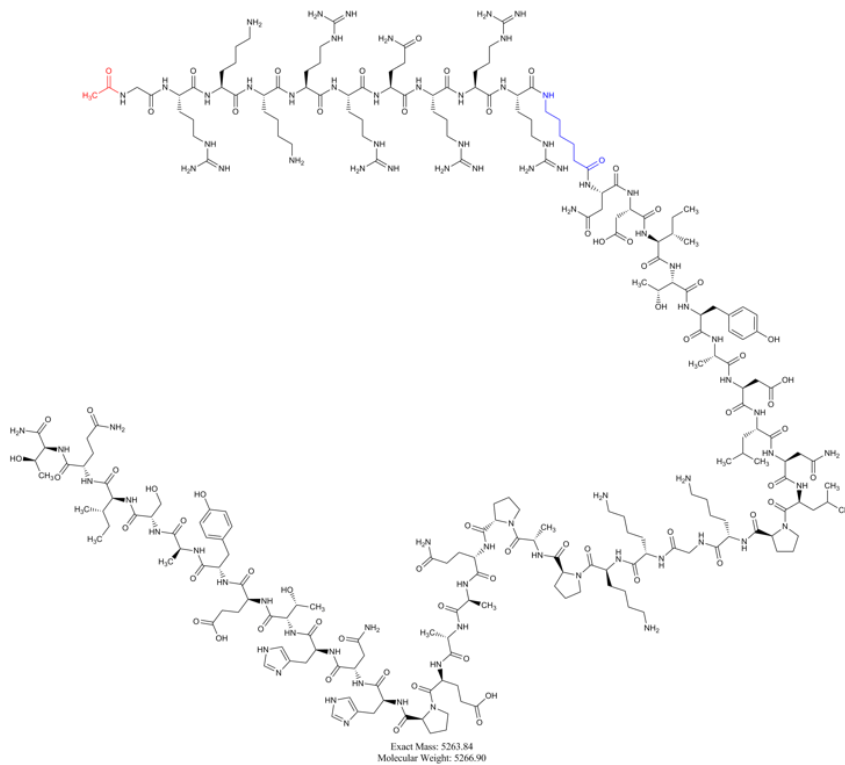


Figura 26. Estructura química del péptido ITIM-1 WT

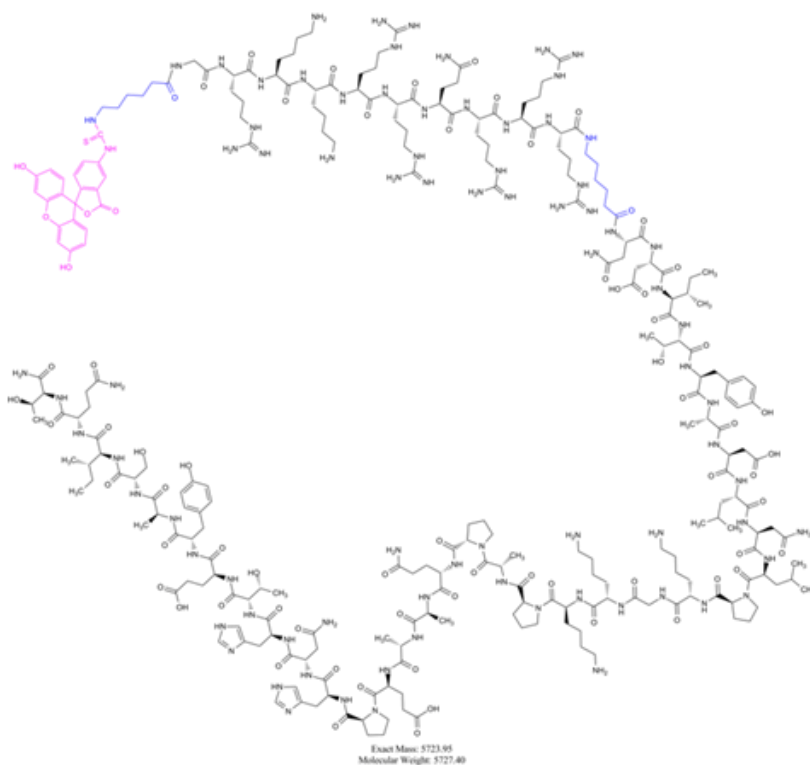


Figura 27. Estructura química del péptido ITIM-1-FITC

C. Caracterización

Tabla 5. Caracterización química de péptidos derivados de SIRPA.

Compuesto	Cantidad	Solubilidad	Rt. ^a (min)	Pureza ^a (%)	Masa exacta ^b (Da)	P.M. ^b (g/mol)	Masa observada ^c ([M + H] ⁺)	P.M. calculado ^b (sal TFA; g/mol)
WT_ITIM-1	20 mg	H ₂ O	9.1	99.6	5263.84	5266.9	5265.1	5951.0
FITC_ITIM-1	18 mg	H ₂ O	10.4	99.1	5723.95	5727.4	5725.2	6411.5

^a Información de tiempo de retención (Rt.) y pureza basados en datos de cromatogramas de HPLC. ^b Masa exacta y peso molecular (P.M. calculados en ChemDraw. ^c Masa iónica observada en análisis MALDI-TOF.

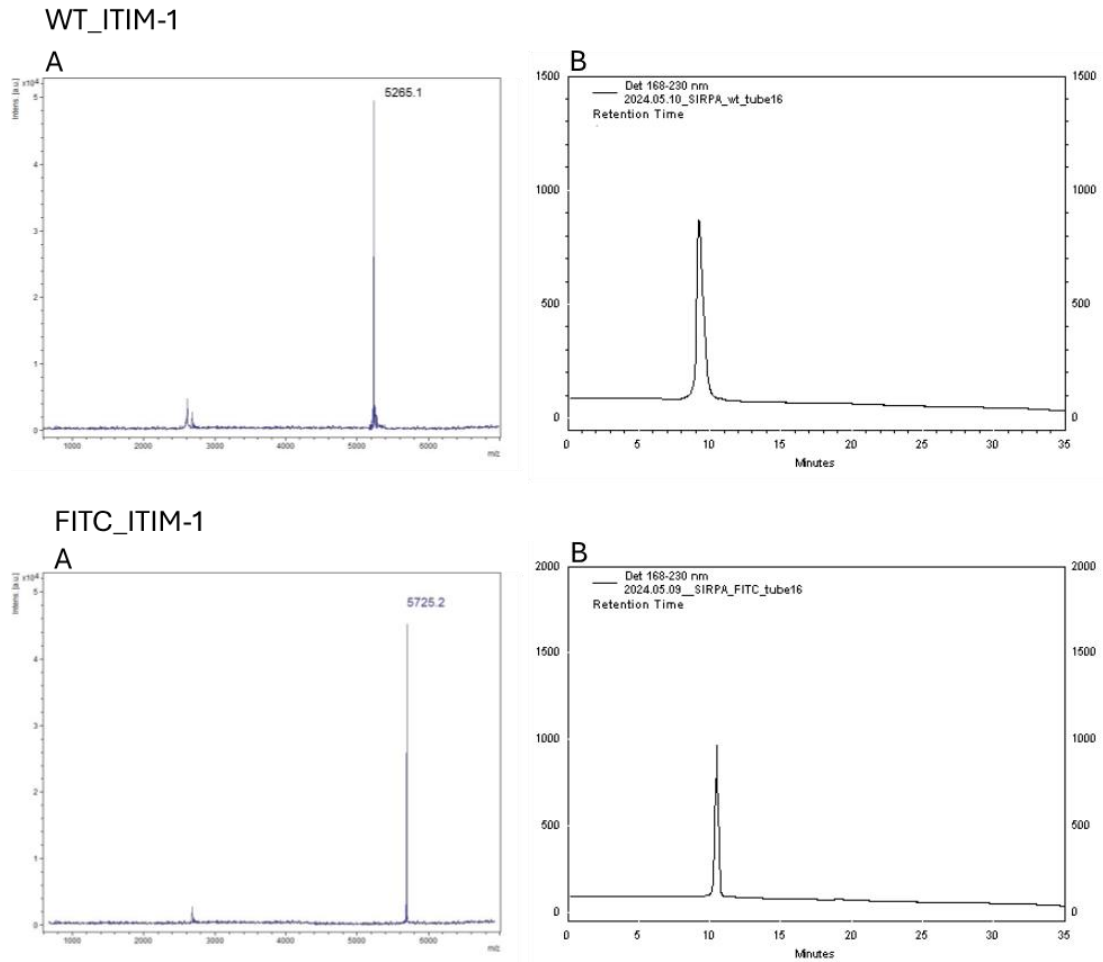


Figura 28. Espectrometría de masas y cromatogramas de los péptidos derivados de SIRPA. A. Espectro de masas obtenido en espectrómetro Bruker Microflex MALDI-TOF utilizando una matriz HCCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico) **B.** Cromatograma analítico de HPLC obtenido en un Beckman System Gold 168 utilizando una columna CSC-Kromasil C18 (5 μ m, 4.6 x 200 mm), un gradiente 0-100% de acetonitrilo en 0.1% TFA (ácido trifluoroacético) acuoso, durante una corrida de 30 ms, con una velocidad de 1 mL/min y detección a 220-280 nm.