



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Modulación de la vía de señalización del
receptor de hidrocarburo de arilo como
estrategia antiviral contra el virus dengue**

Tesis presentada para optar por el título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires,

área Química Biológica

Lic. en Bioq. María Florencia Torti

Directora de tesis: Dra. Cybele Carina García

Consejera de estudios: Dra. Adalí Pecci

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Estrategias Antivirales, Departamento de
Química Biológica, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, marzo de 2023

Modulación de la vía de señalización del receptor de hidrocarburo de arilo como estrategia antiviral contra el virus dengue

Resumen

El virus dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y presenta cuatro serotipos diferentes (DENV 1-4) capaces de provocar enfermedad en seres humanos al ser transmitidos por la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*. DENV es considerado el virus transmitido por artrópodos de mayor importancia a nivel global. Se estima que más de un 53% de la población mundial vive en zonas de riesgo de transmisión de DENV. La infección por DENV causa una gran variedad de cuadros clínicos, desde infecciones asintomáticas hasta cuadros de dengue severo que presentan alta tasa de mortalidad. Actualmente, no existen tratamientos antivirales específicos, por ello es crucial la investigación en nuevos blancos terapéuticos para poder combatirlo.

El receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) es un factor de transcripción clásicamente asociado a mecanismos de depuración de xenobióticos. Los ligandos de AHR provienen de distintas fuentes incluyendo el medioambiente, el microbioma, la dieta y nuestro propio metabolismo. En las últimas décadas, numerosos estudios señalaron que AHR interviene en la regulación de una amplia variedad de procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos. Actualmente se conoce que AHR es un importante regulador del sistema inmune. Recientemente, numerosos estudios han revelado un nuevo papel clave para el AHR durante las infecciones virales. AHR podría ser un importante factor celular pro-viral durante la infección por una amplia gama de virus incluyendo al virus influenza (IAV), Zika (ZIKV), hepatitis C (HCV), virus de la familia herpes e incluso coronavirus humanos (SARS-CoV2), entre otros. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la vía de AHR presenta un rol pro-viral durante la infección por ZIKV, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. El objetivo de esta tesis doctoral fue investigar el rol de la vía de señalización de AHR durante una infección *in vitro* por DENV y evaluar su potencial como blanco terapéutico frente a la infección. Los resultados obtenidos indican que durante la infección DENV induce la expresión y activa AHR. Asimismo, se encontró que la modulación farmacológica de AHR impacta en la replicación viral. El bloqueo de AHR con CH223191 provocó una disminución significativa del genoma viral, el porcentaje de células infectadas por DENV y el rendimiento viral de DENV. Respecto de los mecanismos moleculares subyacentes involucrados en la acción pro-viral de AHR durante la infección por DENV, se encontró que por un lado, AHR es capaz de reducir los niveles de expresión de PML, una proteína ampliamente conocida por

ser parte de la inmunidad intrínseca frente a DENV. Adicionalmente, se encontró que AHR sería capaz de interactuar con PML y promover el desensamble de los PML-NBs. Por otro lado, se encontró que AHR es capaz de modular la expresión de Axl, un candidato a receptor de entrada de DENV que presenta actividad pro-viral durante la infección por este flavivirus. Se encontró que las vías de AHR y Axl son capaces de interactuar durante la infección por DENV, y de hecho, las mismas presentarían sinergia a nivel de facilitar la infección. Todos estos resultados en conjunto indican que AHR es un factor pro-viral importante durante la infección por DENV con potencial para ser empleado como blanco terapéutico frente a la infección.

Palabras clave: receptor de hidrocarburo de arilo (AHR), proteína de la leucemia promielocítica (PML), Axl, flavivirus, antiviral.

Modulation of the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway as an antiviral strategy against dengue virus

Abstract

Dengue virus (DENV) belongs to the *Flaviviridae* family and presents four different serotypes (DENV 1-4) capable of causing illness in humans after the bite by infected mosquitoes of genus *Aedes*. DENV is considered the most important arthropod-borne virus globally. It is estimated that more than 53% of the global population lives in areas at risk of DENV transmission. DENV infection causes a wide scope of clinical presentations, ranging from asymptomatic infections to cases of severe dengue fever with a high mortality rate. Currently, there are no specific antiviral treatments, it is crucial to develop new antiviral strategies against DENV. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor classically associated with xenobiotic clearance mechanisms. AHR ligands come from different sources including the environment, the microbiome, the diet and our own metabolism. Over the last decades, numerous studies have shown that AHR is involved in the regulation of a wide variety of biological processes, both physiological and pathological. Currently, it is known that AHR is an important regulator of the immune system. Recently, increasing evidence revealed an emerging key-role for AHR during viral infections. AHR might be an important cellular pro-viral factor during the infection by a wide range of viruses including influenza virus (IAV), Zika virus (ZIKV), hepatitis C (HCV), herpesviruses and even human coronaviruses (SARS-CoV2), among others. Previous results from our laboratory indicate that the AHR signaling pathway presents a pro-viral role during ZIKV infection, in both *in vitro* and *in vivo* models. The aim of this PhD thesis was to investigate the role of the AHR signaling pathway during DENV infection *in vitro* and to evaluate its potential as a therapeutic target against DENV infection. The results obtained indicate that during infection, DENV induces AHR expression and activates AHR. Furthermore, the pharmacological modulation of AHR impacts on viral replication. It was observed that AHR blockade with CH223191 resulted in a significant decrease in the viral genome, the percentage of cells infected with DENV and the viral yield. Regarding the underlying molecular mechanisms involved in the pro-viral action of AHR during DENV infection, it was found that on one hand, AHR is able to reduce the PML expression levels, which is a protein widely known to be part of intrinsic immunity against DENV. Additionally, it was found that AHR might be able to interplay with PML and promote the disassembly of PML-NBs. On the other hand, it was observed that AHR is capable of modulating the expression of

Axl, a potential DENV entry receptor that exhibits pro-viral activity during infection by this flavivirus. The AHR and Axl pathways were found to be able to interplay during DENV infection, and indeed, they would synergize facilitating the infection. All in all, these results indicate that AHR is an important pro-viral factor during DENV infection with potential to be employed as a therapeutic target against infection.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor (AHR), promyelocytic leukemia protein (PML), Axl, flavivirus, antiviral.

Agradecimientos

A mi directora, Cybele, le agradezco infinitamente por cada oportunidad que me dio, y por la confianza y el apoyo que me brindó todos estos años. Agradezco enormemente que me recibiera en su laboratorio para comenzar mi doctorado. Muchísimas gracias por ayudarme a descubrir qué tipo de profesional quiero ser.

A Elsa, le agradezco inmensamente la confianza que depositó en mí y la oportunidad que me dio junto a Cybele de comenzar mi doctorado en su laboratorio. Gracias por cada palabra, consejo y ayuda que me brindó estos años.

A Fede, le agradezco mucho por toda la ayuda y enseñanzas que me brindó todos estos años tanto en Buenos Aires como en Boston. Muchísimas gracias por la paciencia al responder mis miles de preguntas, los protocolos puestos a punto y por escucharme hablando por horas de AHR.

A Francisco Quintana, le agradezco enormemente que me recibiera en su laboratorio y me permitiera conocer un modo distinto de trabajar: el ritmo Harvard. Agradezco mucho haber tenido la oportunidad de trabajar en el laboratorio Quintana y haber conocido un gran equipo humano que me recibió e integró desde el primer día.

A Peter Hemmerich, le agradezco mucho que me haya recibido en su laboratorio y me haya transmitido su pasión por la microscopía. También agradezco a todo el laboratorio del Core Facility Imaging (CFI) del FLI por recibirme e integrarme, haciendo de mi estadía en Jena una experiencia inolvidable.

Agradezco muchísimo a cada integrante del laboratorio de Virología, por cada palabra, por la ayuda de cada día y por el tiempo compartido. Estoy sumamente agradecida de haber podido transitar estos años por QB, y haber conocido y formado parte de un gran grupo humano que me permitió crecer como profesional y como persona.

A mi familia, le agradezco infinitamente su apoyo incondicional, su confianza en mí y su ayuda en cada paso que he dado. Gracias eternas a mi mamá y a mi papá, a Juan, a Agus y a Delfi, a Dani, a mis tíos/as y a mis primos/as.

Finalmente, agradezco enormemente el apoyo, cada palabra, cada mate y ayuda de mis amigas y amigos de la vida. Gracias infinitas a Clari, a Juli, a Cate, a Ivana, a Belu, a Pili, a José, a Edu, a Lari, a Werner, a Leonora, a Javiera, a Lour, a Flori y a Viqui.

“Es a fuerza de observación y reflexión que uno encuentra un camino”

-Claude Monet-

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	11
Virus dengue	11
1. Historia	11
2. Epidemiología	12
3. Biología molecular del virus dengue	12
4. Cuadros clínicos causados por DENV	14
5. Estrategias preventivas y terapéuticas disponibles	14
Receptor de hidrocarburo de arilo, AHR	15
1. Historia	15
2. Biología molecular y bioquímica de AHR	15
AHR, sistema inmune e infecciones virales	23
1. AHR y el virus de la influenza A	23
2. AHR y los flavivirus	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	27
Hipótesis del trabajo	27
Objetivos del trabajo	27
MATERIALES Y METODOS	29
Reactivos biológicos y químicos	29
1. Células	29
3. Stocks virales	31
3. Drogas empleadas	32
Métodos	32
1. Citotoxicidad de drogas	32
2. Titulación viral	33
3. Extracción de ARN	33
3. Síntesis de cDNA	34
5. RT-PCR cuantitativa y primers utilizados	35
6. Citometría de flujo (FACS)	35
7. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	37
8. Transfección	38
9. Plásmidos empleados para la expresión exógena de AHR y PML	38
10. Microscopía y microscopios empleados	40
11. Análisis y cuantificación de imágenes	40
12. Estadística	43
Diseños experimentales	44
1. Ensayos antivirales	44
2. Ensayos de expresión exógena de proteínas	45
3. Ensayos reporteros de actividad de promotor	45
CAPÍTULO I	49
Resultados	49
1. DENV activa la vía de señalización de AHR durante la infección	49
2. DENV aumenta la expresión de AHR durante la infección y promueve su translocación del citoplasma al núcleo	49
3. DENV promueve la translocación de AHR al núcleo durante etapas tempranas de la infección	51
4. El tratamiento con ARN sintético altera la expresión de AHR	53
5. La modulación farmacológica de AHR impacta en los niveles del genoma viral durante una infección por DENV	55
6. La modulación farmacológica de AHR altera el porcentaje de células infectadas por DENV y los niveles de expresión de proteínas virales	56
7. La modulación farmacológica de AHR afecta la producción de partículas virales infectivas	59

8. El bloqueo farmacológico de AHR disminuye el rendimiento viral de otros serotipos de DENV en infecciones <i>in vitro</i>	60
Modelo parcial del capítulo	63
CAPÍTULO II	66
Introducción	66
Proteína de la leucemia promielocítica (PML)	66
1. Historia	66
2. Biología molecular y bioquímica de los PML y los PML-NBs	66
Resultados	72
1. Estudio de la distribución intracelular de AHR y PML en cultivos no infectados	72
2. El tratamiento con ARN sintético modifica en forma diferencial y dependiente del tiempo la distribución y niveles de AHR y PML	73
3. AHR y PML en ensayos de co- transfección	77
4. AHR y PMLI co-localizan en ensayos de co- transfección	78
5. AHR y PMLIII co-localizan en ensayos de co- transfección	81
6. AHR y PMLIV co-localizan en ensayos de co- transfección	84
7. AHR y PMLV no co-localizan en ensayos de co- transfección	86
8. AHR y PMLVI co-localizan en ensayos de co- transfección	89
9. La distribución nuclear de NS5 de DENV-2 varía de acuerdo a los niveles de expresión de PML en ensayos de co- transfección	91
Modelo parcial del capítulo II.	95
CAPÍTULO III	98
Introducción	98
Axl	98
1. Historia	98
2. Biología molecular y bioquímica de Axl	98
Resultados	104
1. DENV promueve la expresión de Axl y Gas6 durante la infección	104
2. AHR regula la expresión de Axl en ausencia de infección	105
3. El ARN sintético regula la expresión de Axl en forma dependiente de AHR	107
4. AHR regula la expresión de Axl durante una infección por DENV	109
5. Axl regula la expresión de AHR	111
6. El bloqueo farmacológico de AHR y Axl en simultáneo impacta sinérgicamente en los niveles de expresión del genoma de DENV	113
7. AHR y Axl afectan los niveles de expresión de PML en presencia y en ausencia de una infección por DENV	114
8. DENV modifica la expresión de Axl y Gas6 a 24h y 48h en forma diferencial en monocitos humanos en ensayos <i>in vitro</i>	117
Modelo parcial del capítulo III.	122
DISCUSIÓN	124
MODELO INTEGRADOR	135
BIBLIOGRAFIA	137

Introducción

INTRODUCCIÓN

VIRUS DENGUE

1. Historia

La historia del virus dengue (DENV) y de las enfermedades causadas por este virus se remonta a varios siglos atrás.

Una enciclopedia médica china publicada durante la Dinastía Jin que data del los años 265-420 A.C., hace referencia por primera vez a una enfermedad denominada como “veneno de agua” que estaba relacionada con insectos voladores que tuvieran algún tipo de contacto con esa agua. En la actualidad, se cree que dicha enfermedad constituye la primera referencia al cuadro clínico conocido como dengue febril, término acuñado a partir del año 1828 [1,2].

Existen registros que indican que la primera epidemia por cuadros clínicos compatibles con DENV ocurrió en forma prácticamente simultánea en América del Norte, África y Asia entre 1779 y 1780 [1,2]. Resulta interesante destacar que entre los años 1780-1940, se desarrollaron epidemias con patrones de enfermedad semejantes a los causados por DENV y caracterizadas por ser relativamente poco frecuentes pero generalmente de gran magnitud[1].

El virus dengue fue aislado por primera en el año 1943, en Japón, mediante la inoculación de suero de pacientes en ratones empleados para el estudio del cólera -*Suckling mice*- y en el año 1944, en la India, a partir de muestras de suero de soldados estadounidenses[2,3].

El primer aislamiento de este virus cambió para siempre el panorama de las enfermedades causadas por dengue a nivel global. Este hito, constituyó un punto de inflexión en la historia. Permitió no sólo comenzar a realizar un diagnóstico certero de los pacientes con cuadros compatibles con dengue, y con ello, un estudio y registro epidemiológico adecuado, sino, además fue el hallazgo que permitió y propulsó los comienzos del estudio del virus, la enfermedad y posibles estrategias para poder combatirla.

Un dato curioso e interesante es que aún no se conoce exactamente el por qué de su nombre. Existen varias teorías al respecto. Una de ellas, y la más aceptada en la actualidad, indica que su nombre proviene del Swahili, una lengua africana hablada en varios países de África pero principalmente en Tanzania y Kenia. En particular, se cree que su nombre proviene de la frase “*Ka-dinga pepo*” que significa “convulsión de tipo calambre causada por un espíritu maligno” la cual hacía alusión a las características clínicas que presentaban las personas que contraían la enfermedad y a la causa que creían que la provocaba[2].

Desde su primer aislamiento hasta el día de hoy, se han descubierto y descrito cuatro serotipos de este virus, nombrados del 1 al 4 de acuerdo al orden en que fueron identificados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Curiosamente, estudios de genómica evolutiva y comparativa han permitido evidenciar que la aparición de los cuatro serotipos ocurrió hace aproximadamente unos 1000 años atrás, mientras que el establecimiento de una transmisión endémica en humanos comenzó hace relativamente unos pocos cientos de años[4].

2. Epidemiología

DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* y presenta cuatro serotipos (DENV 1-4) capaces de provocar enfermedad en seres humanos al ser transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Aedes* infectados [5].

En los últimos 50 años, la incidencia de esta arbovirosis ha pasado de presentaciones esporádicas a considerarse un grave problema de salud pública con un gran impacto a nivel social y económico[5,6].

Actualmente, DENV es considerado el virus transmitido por artrópodos de mayor importancia a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que se producen aproximadamente 390 millones de infecciones por DENV al año, afectando principalmente a países de las zonas tropicales y sub-tropicales del planeta (incluyendo a la Argentina), regiones que corresponden a los nichos ecológicos del mosquito-vector[5-8].

Estudios epidemiológicos han indicado que en 2015 aproximadamente el 53% de la población mundial (cerca de 3.830 millones de personas) vivía en zonas de riesgo para la transmisión de este virus [9]. Reportes recientes basados en análisis epidemiológicos que comprenden variables como el clima, el calentamiento global, la población y las proyecciones socio-económicas a nivel global, junto con factores de propagación de los mosquitos *Aedes*, predicen una extensión de la enfermedad por dengue a otras regiones del planeta en los próximos años[9].

3. Biología molecular del virus dengue

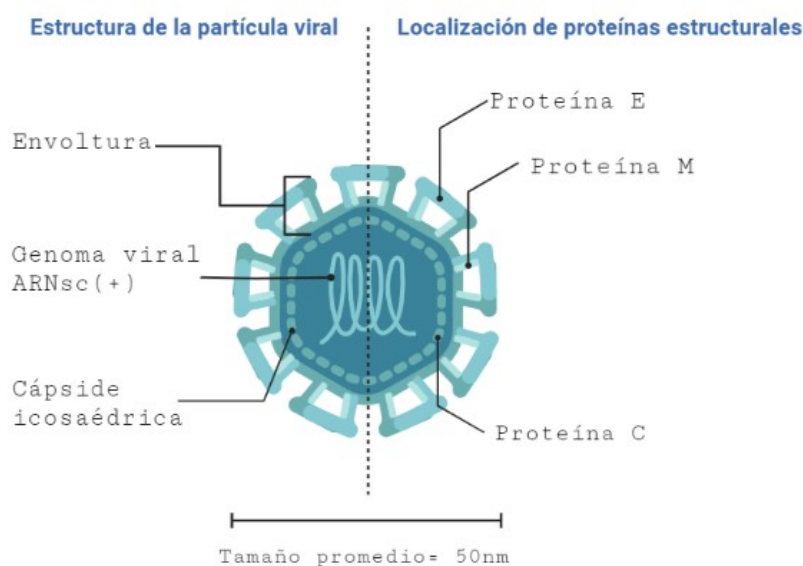
Los flavivirus constituyen una amplio y diverso grupo que incluye más de 70 especies de virus diferentes. En esta familia se encuentran incluidos varios virus que infectan humanos de gran importancia sanitaria, como lo son: el virus de la fiebre amarilla (YFV), virus Zika (ZIKV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la encefalitis japonesa (JEV) y virus de West Nile (WNV), entre otros. [10].

Como se ha mencionado previamente, DENV presenta cuatro serotipos que son antigénicamente diferentes entre sí. Cada uno de ellos, presenta variaciones genéticas

considerables que permiten establecer y diferenciarlos filogenéticamente en distintos genotipos [4]. Más allá de sus diferencias, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 exhiben una homología de secuencia tanto a nivel genómico como proteico[4].

El virión de DENV se caracteriza por presentar un genoma constituido por una única molécula de ARN de simple cadena (ARNsc) de polaridad positiva. Ésta, se encuentra encapsulada por una cápside proteica icosaédrica y cubierta por una envoltura externa lipídica, que se encuentra constituida por membranas fosfolipídicas provenientes de la célula hospedadora y proteínas virales incluidas en ella (Figura 1A).

A. Estructura de un virión de DENV



B. Estructura del genoma y poliproteína de DENV

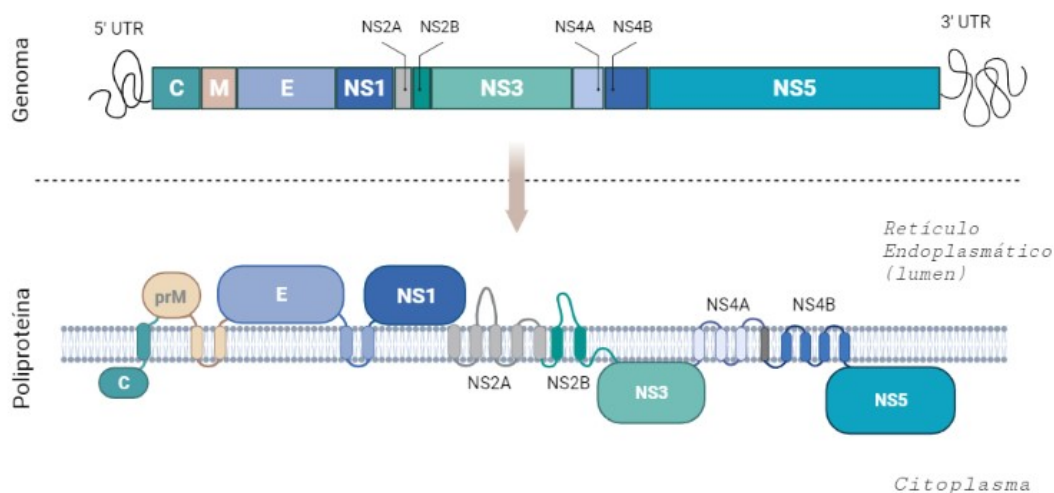


Figura 1. Anatomía de un virión de DENV y estructura del genoma viral. Esquema basado en información obtenida de Barrows *et al.* 2018.

El genoma de DENV cuenta con un único marco de lectura abierto (*open reading frame, ORF*) largo que es traducido como una poliproteína y que posteriormente es clivada mediante una combinación de peptidasas de señal celular y la proteasa viral NS2B / NS3 para producir tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) [11](Figura 1B).

Respecto del ciclo de replicación viral, al igual que otros virus con genoma de ARNsc con polaridad positiva, DENV replica casi exclusivamente en el citoplasma. Sin embargo, ha sido reportado que DENV al igual que varios virus con genoma de ARN, son capaces de interactuar con componentes del núcleo de la célula hospedadora como parte de la estrategia viral para antagonizar la respuesta antiviral del hospedador [12–16]. Los virus logran este cometido ya sea secuestrando factores nucleares y / o traficando sus propias proteínas hacia el núcleo para impactar en la expresión de genes del hospedador, y así atenuar la respuesta antiviral [13–17]. En este contexto, se ha reportado que tres proteínas de DENV son capaces de acceder al núcleo del hospedador en células infectadas: C, NS3 y NS5 [18–23].

4. Cuadros clínicos causados por DENV

La infección por DENV provoca un amplio espectro de cuadros clínicos, que varía desde infecciones asintomáticas hasta casos de dengue grave, que presentan una alta tasa de mortalidad. Los cuadros clínicos severos han sido asociados a la infección consecutiva con diferentes serotipos del virus [5,24]. Los anticuerpos neutralizantes que protegen contra el virus que causó la primo-infección, promueven la infección por otro serotipo de DENV, provocando que se desencadene rápidamente un cuadro clínico más complejo y de mayor severidad, con alta tasa de mortalidad. Este fenómeno se conoce como ADE (Antibody-Dependent Enhancement) y no explica la totalidad de los casos más severos por dengue evidenciando que los casos graves, probablemente son el resultado de una combinación de diferentes factores que aún no se encuentran definidos en la actualidad [25].

5. Estrategias preventivas y terapéuticas disponibles

El reto de desarrollar una vacuna contra todos los serotipos del DENV, radica en el hecho de que es crítica una respuesta inmune equilibrada frente a cada serotipo. Existen algunos candidatos a vacunas en diferentes etapas de ensayo clínico, pero en la actualidad no se encuentran vacunas disponibles para ser administradas a la población [26]. De la misma manera, no existen tratamientos específicos contra DENV, por lo cual es crucial seguir explorando los mecanismos subyacentes involucrados en su ciclo de replicación viral y patogenicidad, para poder desarrollar nuevas estrategias antivirales para poder combatirlo.

En la actualidad, se conoce la importancia del medio ambiente como factor determinante de la susceptibilidad del hospedador y del propio patógeno. Explorar el impacto de factores ambientales en la infección, se ha tornado fundamental para entender la patogénesis y desarrollar nuevas estrategias antivirales contra los virus.

RECEPTOR DE HIDROCARBURO DE ARILO, AHR

1. Historia

El receptor de hidrocarburo de arilo (aryl hydrocarbon receptor, AHR) es una proteína ancestral [27]. Sin embargo, recién en el año 1976 pudo ser aislada por primera vez [27].

En las últimas décadas, numerosos estudios de genómica evolutiva y comparativa han revelado la existencia de homólogos de AHR en la mayor parte de los animales con simetría bilateral, incluyendo invertebrados tales como artrópodos, anélidos, moluscos y nematodos, entre otros [27]. Asimismo, se ha podido identificar homólogos de AHR en animales no bilaterales pertenecientes a los taxones *Cnidaria* y *Placozoa* [27].

La presencia de AHR en los taxones mencionadas anteriormente indicaría que, en efecto, su ancestro común, que se estima habría vivido hace 600 millones de años, debería haber contado con algún homólogo de AHR [27].

AHR ha sido clásicamente asociado a mecanismos de depuración de xenobióticos, debido a que regula la expresión de enzimas involucradas en la eliminación de contaminantes ambientales. Sin embargo, en las últimas décadas, el estudio sistemático de dicho receptor y de las posibles funciones en las que podría estar involucrado, permitieron descubrir que en realidad, se trata de una proteína pleiotrópica, con múltiples funciones e impacto en diversos procesos biológicos. En la siguiente sección, profundizaremos conceptos de la biología molecular y bioquímica de AHR.

2. Biología molecular y bioquímica de AHR

AHR es un factor de transcripción activado por ligando perteneciente a la familia de factores de transcripción bHLH/PER-ARNT-SIM (PAS)[28]. AHR, si bien es una proteína sumamente conservada evolutivamente y con distribución ubicua, también es sumamente dinámica: sus niveles de expresión varían entre células, tejidos, a lo largo de la vida y durante el día de acuerdo al ciclo circadiano[29–31].

AHR interviene en un amplio espectro de procesos biológicos y toxicológicos en forma específica para cada especie, tejido y célula. Desempeña un papel crucial en la detección, integración y respuesta a señales ambientales, la determinación del destino celular,

el ciclo celular, la homeostasis, durante el desarrollo embrionario e incluso durante procesos involucrados en el envejecimiento, entre otros[28,32–37].

En términos de su estructura, AHR cuenta con un dominio bHLH (basic helix–loop–helix) que se encuentra en el extremo amino-terminal de la proteína y que está involucrado en el reconocimiento y unión a una secuencia específica de ADN; el denominado elemento de respuesta a AHR (AHR response element, AHRE) también conocido como elemento de respuesta a xenobióticos (xenobiotics response element, XRE) o elemento de respuesta a dioxinas (dioxins response element, DRE). Consecutivamente, se ubican los dominios PAS-A y PAS-B que intervienen en la hetero- y homo-dimerización del receptor. Cabe destacar que en el PAS-B también se aloja el dominio de unión a ligando (ligand binding domain, LBD). El LBD se caracteriza por presentar bolsillos hidrofóbicos que permiten la interacción con los ligandos. Finalmente, en el extremo carboxilo-terminal se encuentran dominios involucrados en la transactivación/ transrepresión [38,39].Figura 2.

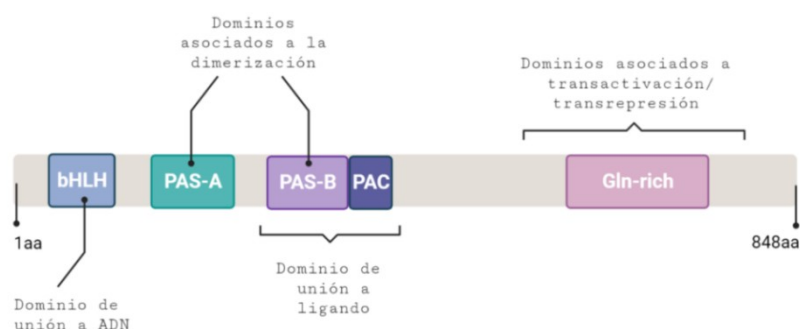


Figura 2. Esquema simplificado de la secuencia proteica del AHR humano con ubicación de dominios y funciones. [38–40] y Uniprot.

En estado estacionario o libre de ligando, AHR es parte de un complejo multiproteico citoplasmático compuesto por dos moléculas de la proteína chaperona *heat-shock protein 90* (HSP90), la proteína co-chaperona p23 (p23) y la proteína X-asociada al virus de la hepatitis B (XAP2/AIP/ARA9) [34,41–49]. Sus funciones incluyen: la estabilización de la conformación de AHR, la protección contra la degradación proteolítica y la contribución al establecimiento de la localización subcelular del receptor. Luego del reconocimiento y la unión del ligando (L), AHR sufre un cambio conformacional que expone la señal de localización nuclear (nuclear localization signal, NLS), lo que permite que el complejo L-AHR-HSP90-p23 se traslade al núcleo a través de β -importinas. Es importante destacar que algunos trabajos sostienen que XAP2 está implicado en el anclaje citoplasmático del complejo de AHR, mientras que otros reportes apoyan que impide una adecuada interacción del NLS con las β -importinas, por lo que se propone que XAP2 es liberado del complejo AHR antes de la translocación núcleo-citoplasma[34,43,44,46–56]. En el interior del núcleo, las chaperonas se desensamblan del complejo y AHR, aún unido a su ligando, heterodimeriza

con el translocador nuclear del receptor de hidrocarburo de arilo (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT). Finalmente, el complejo L-AHR-ARNT interactúa con sus elementos de respuesta de ADN (AHRE, DRE o XRE) regulando la expresión de diferentes genes[34,37,44,48,49,57].

En la actualidad, la vía de señalización previamente descrita se conoce como la vía de canónica de AHR y la misma involucra la activación de la expresión de genes Cyp450 que codifican para las enzimas del citocromo P450. Particularmente, para algunos miembros de las familias 1 y 2: CYP1A1, CYP1B1 y CYP2A1. Asimismo, la vía canónica de AHR induce la expresión del represor del receptor de hidrocarburo de arilo (aryl hydrocarbon receptor repressor, AHRR), que se encuentra involucrado en un mecanismo de auto-regulación negativo de AHR [34,37].Figura 4.

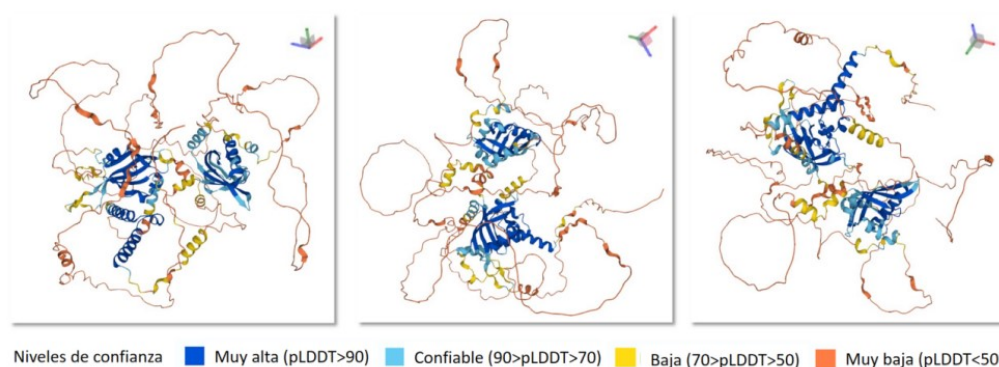


Figura 3. Modelo predictivo de la estructura tridimensional de AHR. Modelo producido con el software AlphaFold. AlphaFold produce una puntuación de confianza por residuo (pLDDT) entre 0 y 100. Algunas regiones con una pLDDT baja puede corresponder a regiones que están desestructuradas de manera aislada. En la esquina superior derecha de cada imagen se ilustra la distribución espacial 3D del modelo. La figura fue realizada con información e imágenes traducidas y adaptadas de UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35869/entry>. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P35869>

Por otro lado, se ha determinado que AHR es capaz de controlar procesos biológicos a través de una vía no canónica, que puede ser genómica o no genómica [58]. Por ejemplo, AHR puede promover el aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{+2} o regular la actividad de la quinasa de adhesión focal. Asimismo, varios estudios señalan que AHR es capaz de regular la actividad de tirosina quinasa de c-SRC. Se ha reportado que c-SRC puede interactuar físicamente con AHR y HSP90 cuando se encuentran formando parte del complejo proteico citoplasmático. Luego del reconocimiento del ligando por parte de AHR, éste sufre un cambio conformacional que promovería la liberación y activación de c-SRC, gatillándose una cascada de fosforilaciones intracelular [58].

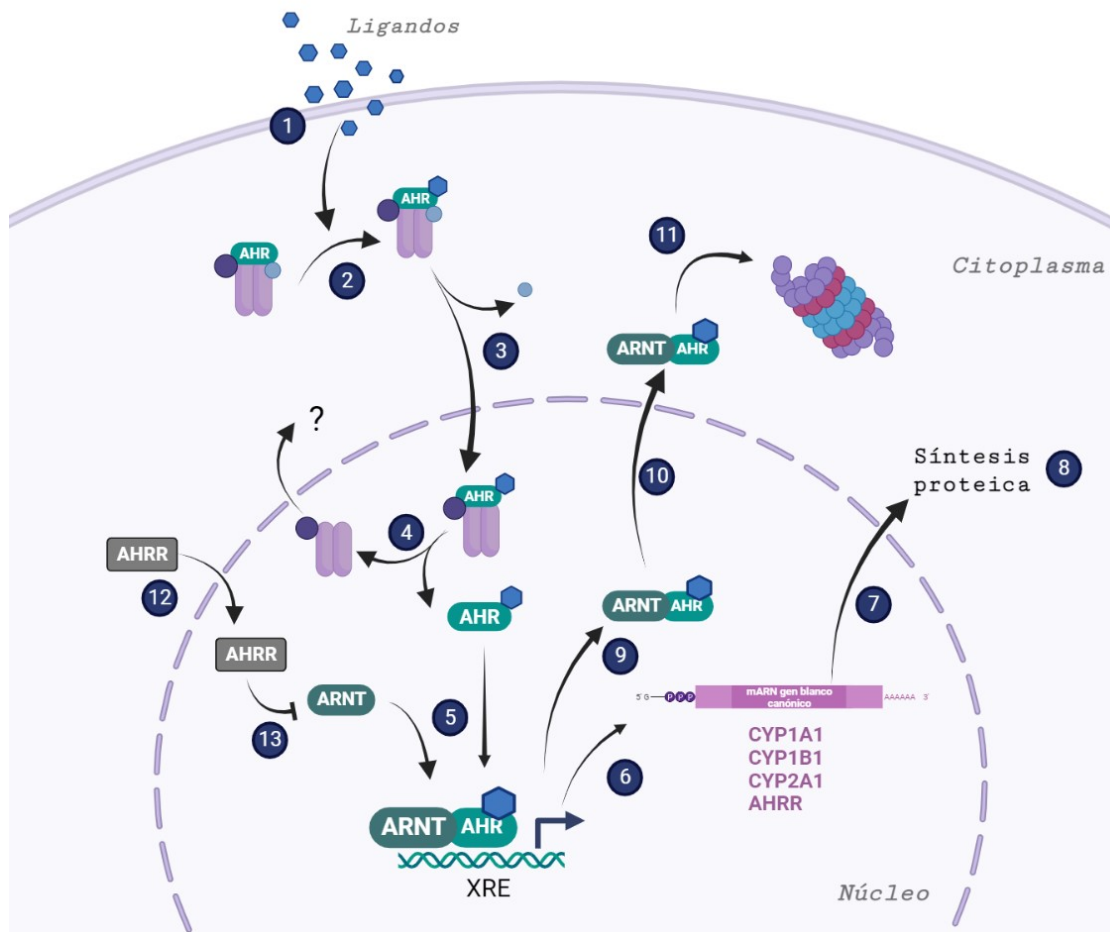


Figura 4. Esquema simplificado de la vía de señalización canónica de AHR. En estado inactivo o ausencia de ligando AHR se encuentra formando parte de un complejo multiproteico en el citoplasma junto con dos moléculas de HSP90, p23 y XAP2 (AIP). Cuando se produce el ingreso de ligandos (L) de AHR a la célula (1), AHR se une a los reconoce, se une y sufre un cambio conformacional (2) que promueve la exposición de una señal de localización nuclear al mismo tiempo que desencadena el desacople de la proteína XAP2, eventos que posibilitan la translocación nuclear del complejo L/AHR/HSP90/p23 (3). Una vez dentro del compartimiento nuclear, las proteínas co-chaperonas se desensamblan (4) y AHR es capaz de heterodimerizar con el translocador nuclear de AHR (ARNT) y el heterodímero es capaz de regular la expresión de diversos genes (5). En particular el complejo L/AHR/ARNT interactúa con sus elementos de respuesta de ADN (AHRE/DRE/XRE). AHR estimula la expresión de distintos genes canónicos (6): enzimas depuradoras de la familia citocromo p450 (CYP1A1, CYP1B1, CYP2A1) y por otro lado, también induce la expresión del represor de AHR (AHRR) capaz de competir por los sitios de heterodimerización con ARNT y así prevenir la actividad de AHR (12,13). Una vez que el complejo L/AHR/ARNT ha cumplido su función, el mismo se libera del AHRE (9), transloca al citoplasma (10) y sufre una degradación proteasomal (11).

A su vez, se ha descrito que AHR estaría involucrado en procesos de ubiquitinación de proteínas marcadas para degradación vía proteasoma, ya que podría ejercer funciones como Ubiquitina E3 ligasa. En cuanto a la regulación genómica no canónica, se ha reportado que AHR es capaz de heterodimerizar con distintas proteínas nucleares, incluidos factores de transcripción, lo cual le permite modular la actividad de dichas proteínas mediante mecanismos de transactivación/transrepresión o a través de interacciones proteína-proteína. En este contexto, se ha determinado que AHR no sólo presenta *cross-talk* con NFκB, AP-1,

ER y GR, sino que además, interactúa con el Factor 6 similar a Krüppel (KLF6) y C/EBP[34,35,37,41,58–60](Figura 5).

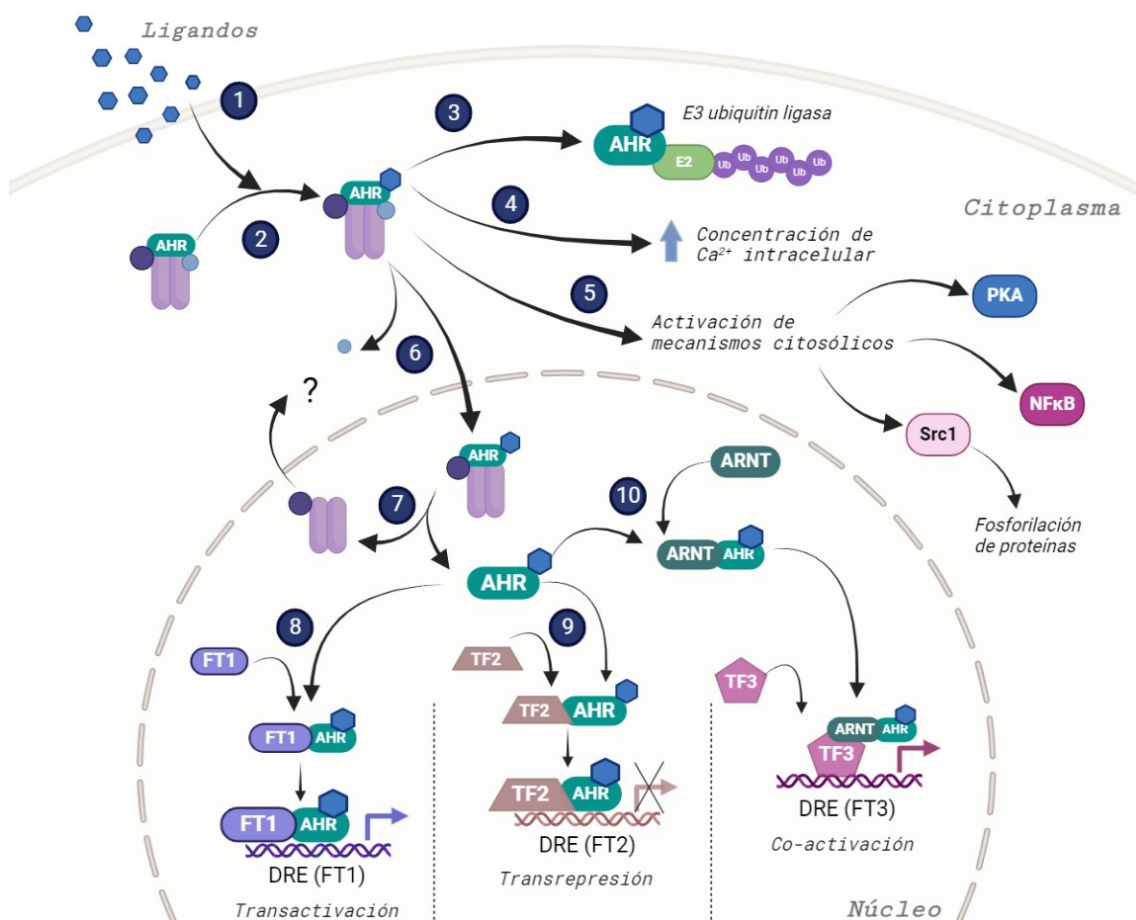


Figura 5. Esquema simplificado de la vía de señalización NO canónica de AHR. En estado inactivo o ausencia de ligando AHR se encuentra formando parte de un complejo multiproteico en el citoplasma junto con dos moléculas de HSP90, p23 y XAP2 (AIP). Cuando se produce el ingreso de ligandos (L) de AHR a la célula (1), AHR se une a los reconoce, se une y sufre un cambio conformacional (2) que permite o bien que AHR lleve a cabo diferentes funciones a nivel citoplasmático (3,4,5) o bien que quede expuesta de una señal de localización nuclear al mismo tiempo que desencadena el desacople de la proteína XAP2, eventos que posibilitan la translocación nuclear del complejo L/AHR/HSP90/p23 (6). Respecto de las funciones citoplasmáticas descritas para AHR, ha sido reportado que AHR puede desempeñar un rol como E3 ubiquitin ligasa (3), aumentar la concentración intracelular de Ca^{2+} (4) o incluso regular activación de distintas proteínas citoplasmáticas y modular así otras cascadas de señalización (5). Dentro del compartimiento nuclear (6), las proteínas co-chaperonas se desensamblan (7) y L/AHR es capaz de heterodimerizar (8,9) con distintos factores de transcripción y regular la expresión de sus genes blanco por transactivación (8) o transrepresión (9). Finalmente el complejo conformado por L/AHR/ARNT también es capaz de actuar como co-factor y regular la actividad de otros factores de transcripción mediante interacciones proteína-proteína (10).

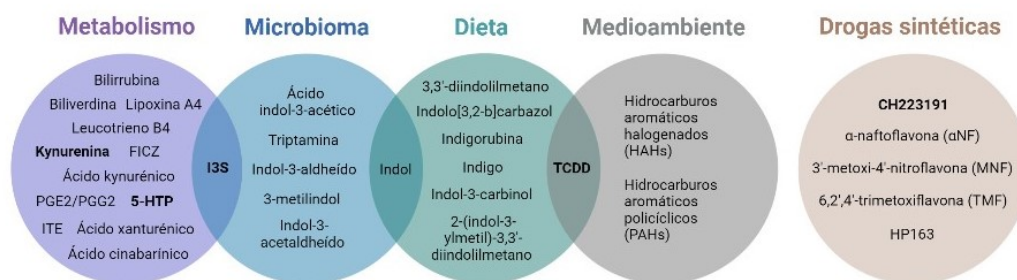
Los primeros ligandos de AHR descubiertos fueron hidrocarburos. En particular, los hidrocarburos aromáticos policíclicos no halogenados (non-halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) y los hidrocarburos aromáticos halogenados (halogenated aromatic hydrocarbons, HAH), que son contaminantes ambientales, que en su mayoría, son producto de

actividades antropogénicas. Estos compuestos son muy abundantes y persistentes en el medioambiente debido a su larga vida media y al hecho de que se bioacumulan en la cadena trófica. Su depuración a nivel de los organismos vivos está mediada por las enzimas catabólicas CYP1A1, CYP1B1 y CYP2A1. El TCDD es el contaminante más famoso de los HAH, ampliamente conocido por sus efectos tóxicos, presuntamente provocados mediante la activación de AHR [61,62].

Se ha documentado extensamente la toxicidad de PAHs y HAHs en los seres humanos, así como en otras especies y, curiosamente, se ha estimado que más del 90% de la exposición humana a estos compuestos se produce por la ingesta de alimentos contaminados, especialmente de alimentos con alto contenido graso, como lo es la carne proveniente de ciertos tipos de peces, entre otros[34,61–67].

A lo largo de las últimas décadas, varios estudios han indicado que el AHR es capaz de reconocer una amplia variedad de ligandos que provienen de diversas fuentes tales como el medioambiente, el microbioma, la dieta o incluso nuestro propio metabolismo. Por estos motivos, actualmente se clasifican en ligandos naturales o sintéticos, endógenos o exógenos, dependiendo de su naturaleza y fuente [34,35,68,69].

A) Clasificación de ligandos de AHR de acuerdo a su fuente



B) Estructura y actividad de ligandos de AHR relevantes

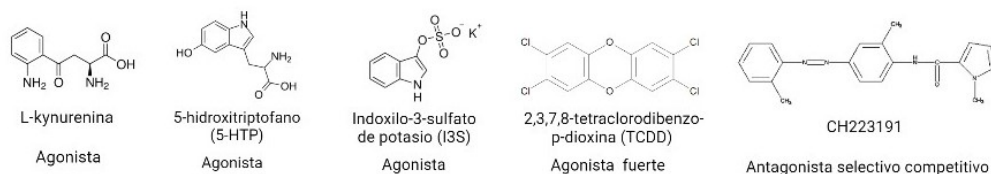


Figura 6. Clasificación de ligandos de AHR .(A)Clasificación de ligandos seleccionados de AHR de acuerdo a su fuente. (B) Estructura molecular y actividad de ligandos seleccionados relevantes para la tesis.

El creciente interés en el estudio de la vía de señalización AHR en diferentes escenarios, fisiológicos y patológicos, ha promovido la exploración de nuevos compuestos con capacidad para modular y estudiar dicha vía.

Los activadores o agonistas de AHR más utilizados incluyen al 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD, "dioxina") que hoy en día constituye el agonista del AHR

prototípico. TCDD es un subproducto industrial sintético que persiste como contaminante en el medio ambiente y que es bien conocido por su alta toxicidad en humanos en otras especies. El 6-formilindolo(3,2b)carbazol (FICZ) un foto-producto endógeno del triptofano (Trp). El derivado endógeno del indol, indoxilo 3-sulfato (IS) y la kynurenina (Kyn), un metabolito de la vía catabólica del triptofano. producto de la actividad enzimática de la triptofano 2,3-dioxigenasa 2(TDO2) o de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 , 2 (IDO1,IDO2) sobre el Trp. considerados como potentes agonistas endógenos del AHR. En lo que respecta a los inhibidores de AHR (antagonistas), los compuestos más empleados son el 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH223191) que es un antagonista competitivo potente y específico de AHR de origen sintético. CH223191 inhibe preferencialmente TCDD y moléculas relacionadas con los HAHs. Por otro lado, dentro de los bloqueadores de AHR también se encuentran las flavonas tales como α -naftoflavona (α -NF), 3-metoxi-4-nitroflavona (MNF) y 6,2,4-trimetoxiflavona (TMF), compuestos que también son de origen sintético[32,63,65,69–77].

Recientemente, se ha establecido que AHR es un regulador clave de las respuestas inmune innata y adaptativa, tanto en estado fisiológico como patológico, por lo que en la actualidad, muchas líneas de investigación se encuentran enfocadas en investigar la vía de señalización del AHR como potencial blanco terapéutico para tratamientos en los que se lleve a cabo una inmunomodulación [35,64,69,78–81].

Respecto a la inmunidad antiviral, se ha reportado que AHR no sólo transreprime a NF κ B, un factor de transcripción fundamental de la respuesta inmune innata, sino que también suprime la vía de señalización del interferón tipo I (IFN-I) durante infecciones virales. De hecho, se ha sugerido que el AHR está involucrado en un bucle de retroalimentación negativa que limita la potencial inmunopatología asociada a la acción no controlada por parte de IFN-I [78,82–86].

Fuente	Compuesto	Tipo de ligando	Procedencia
Metabolismo del hospedador	L-Kynurenina (L-Kyn, Kyn)	Agonista	Catabolismo del triptofano. IDO1, IDO2 and TDO
	Ácido Kynurenico (KA)	Agonista	Catabolismo del triptofano
	5-hidroxi-L-triptofano (5HTP)	Agonista	Vía del triptofano y serotonina
	2-(1'H-indo-3'-carbonil)-tiazol-4-carboxílico ácido metil éster (ITE)	Agonista	Producido a partir de triptofano y cisteína
	Indoxilo-3-sulfato (I3S)	Agonista	Metabolismo del hospedador y microbiano
	3-Metilindol	Agonista	Metabolismo del hospedador y microbiano
	Bilirrubina	Agonista	Metabolismo del grupo hemo
	Biliverdina	Agonista	Metabolismo del grupo hemo
	Prostaglandina E2 (PGE2)	Agonista	Derivado del ácido araquidónico
	Prostaglandina G2 (PGG2)	Agonista	Derivado del ácido araquidónico
	Leucotrieno B4 (LB4)	Agonista	Derivado del ácido araquidónico
	Lipoxina A4 (LXA4)	Agonista	Derivado del ácido araquidónico
	6-Formil indolo[3,2-b] carbazol (FICZ)	Agonista	Fotoproducto. Generación dependiente e independiente de radiación UVB.
Microbioma	Indol	Agonista	Metabolismo microbiano
	Indoxilo-3-sulfato (I3S)	Agonista	Metabolismo del hospedador y microbiano
	3-Metilindol	Agonista	Metabolismo del hospedador y microbiano
	Indol-3-aldehído (1H-Indole3-carboxaldehído)	Agonista	Metabolismo microbiano
	Ácido Indol-3-acético (IAA)	Agonista	Metabolismo microbiano
	Indol-3-acetaldehído	Agonista	Metabolismo microbiano
	Triptamina (TA)	Agonista	Metabolismo microbiano
Dieta	Indol	Agonista	Compuesto dietario
	Indol-3-acetonitrilo (I3ACN)	Agonista	Verduras crucíferas
	Indol-3-carbinol (I3C)	Agonista	Verduras crucíferas
	3,3'-diindolyl metano (DIM)	Agonista	Verduras crucíferas
	Indolo[3,2-b] carbazol (ICZ)	Agonista	Verduras crucíferas
	2-(indol-3-ylmethyl)-3,3'-diinolyl metano (Ltr-1)	Agonista	Verduras crucíferas
	Indigo	Agonista moderado	Compuesto fitoquímico derivado de la planta
Medioambiente	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD,dioxina)	Agonista fuerte	Subproducto industrial sintético. Contaminante ambiental persistente. Presente en humo de cigarrillo.
	Bifenilos policlorinados(PCBs) tipo dioxinas	Agonista	Producto industrial sintético. Contaminante ambiental persistente.
	Furanos dibenzo policlorinados (PCDFs,Furanos)	Agonista	Producto de la combustión de emisiones naturales y actividades antropológicas. Contaminante ambiental persistente
	Benzo[a]pireno	Agonista	Humo de cigarrillo y aerosol de cigarrillo electrónico (presuntamente), gases de escape de vehículos y como subproducto de otros procesos de combustión
	Benzo(k)fluoranteno	Agonista	Contaminante medioambiental procedente de la combustión incompleta o de la pirrólisis de materias orgánicas, especialmente de los combustibles fósiles y del tabaco
Drogas sintéticas	Ácido (2-metil-4-o-tolylazo-fenil)-amida 2-metil-2H-pirazol-3-carboxílico (CH223191)	Antagonista selectivo competitivo	Sintético
	α-naftoflavona (αNF)	Antagonista	Sintético
	3'-metoxi-4'-nitroflavona (MNF)	Antagonista	Sintético
	6,2',4'-trimetoxiflavona (TMF)	Antagonista competitivo	Sintético

Tabla 1. Ligados seleccionados de AHR según fuente, tipo de actividad y procedencia.

AHR, SISTEMA INMUNE E INFECCIONES VIRALES

Se conoce poco sobre la conexión entre AHR, el sistema inmune y las infecciones virales, sin embargo, el estudio del rol de AHR durante infecciones virales constituye un campo emergente que reviste crucial interés en la actualidad.

La investigación de AHR en el contexto de las infecciones virales, ha permitido poner en evidencia que el mismo cumpliría un rol fundamental tanto en infecciones por virus con genoma de ADN como de ARN [87]. En particular, la gran mayoría de los trabajos publicados han evidenciado que AHR presenta un rol pro-viral durante las infecciones virales [87]. Sin embargo, ciertos estudios indican que frente a algunos virus, AHR desempeñaría un rol anti-viral.

En lo que respecta a virus que infectan humanos, AHR presenta un rol pro-viral durante la infección por el virus de la influenza A (IAV), virus Zika (ZIKV), virus de la hepatitis C (HCV), virus herpes simplex tipo I (HSV-1), citomegalovirus humano (HCMV), virus de Epstein Barr (EBV), virus asociado al Sarcoma de Kaposi (HHV-8), virus del papiloma humano (HPV), virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-1), coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (SARS-CoV2) y virus Junín (JUNV)[87–103][104–110]. Por otro lado, algunos reportes sugieren que AHR desempeña un rol anti-viral frente al virus coxsackie B3 [111,112], el virus herpes simplex tipo I (HSV-1) y virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-1)[87,113]. Un resumen de los estudios previamente mencionados se visualiza en la Tabla 2.

En el contexto de infecciones virales por virus de importancia veterinaria, AHR presenta un rol pro-viral frente a el coronavirus de la hepatitis murina (MHV), coronavirus canino (CCoV), el virus herpes bovino de tipo 1 (BHV1) y el citomegalovirus de rata (RCMV), mientras que exhibiría un rol anti-viral frente al virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) [114–119]. Un resumen de los estudios previamente mencionados se visualiza en la Tabla 2.

A continuación se abordará brevemente los aspectos explorados más notables sobre el rol que cumpliría AHR durante la infección por IAV, HCV y ZIKV.

1. AHR y el virus de la influenza A

El estudio del rol de AHR en el contexto de la infección por el virus de la influenza A (IAV) ha sido, sin lugar a dudas, el más abordado y en el que más se ha avanzado en las últimas dos décadas, lo que convierte a este virus en el más explorado en este campo en la actualidad. En los últimos años, se ha podido describir cómo se encuentra involucrado AHR en la modulación de las respuestas inmune innata y adaptativa frente a este virus.

En lo que respecta a la respuesta inmune innata y la inflamación, se ha reportado que la activación de AHR por TCDD previo a la infección por IAV modifica la respuesta de las células dendríticas (DCs), los neutrófilos, las células NK y los macrófagos, y produce cambios en el perfil de citoquinas [89,90,93,94,98,120–124]. En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, se ha informado de que la activación de AHR inducida por la TCDD antes de la infección por IAV, modifica la respuesta no sólo de los linfocitos T CD4+ y T CD8+, sino también de los linfocitos B y la respuesta de anticuerpos [91,93,120,121,124,125]. Se ha reportado que la exposición de ratones a TCDD previo a una infección con IAV, provoca una ablación significativa de la respuesta de linfocitos T contra IAV [93,120,121,124–126].

2. AHR y los flavivirus

En lo que respecta a la infección por flavivirus, en la actualidad se ha estudiado la relevancia de AHR durante la infección por el virus de la hepatitis C (HCV) y virus Zika (ZIKV), y en ambos casos, se ha demostrado que AHR presenta un rol pro-viral durante la infección [99,103].

HCV activa la vía AHR-CYP1A1 durante la infección *in vitro*. Se ha reportado que HCV activa AHR para controlar el metabolismo lipídico celular, y con ello, impactar en la formación de las gotas lipídicas celulares (LD). Se ha demostrado que al incrementar el número y tamaño de estas plataformas de ensamblaje virales, aumenta la progenie de HCV *in vitro*. Por lo tanto, se propone que AHR desempeña un rol pro-viral durante la infección [103].

En lo referido a AHR durante una infección por ZIKV, se ha demostrado recientemente que ZIKV induce la sobre-expresión de IDO-1 y AHR. Se ha identificado que la vía de señalización de AHR es un factor pro-viral clave durante la infección por ZIKV. Ha sido descrito que la infección por ZIKV desencadena la activación de AHR, limitando la producción de IFN-1. Dado que la activación del AHR suprime la inmunidad antiviral intrínseca, en consecuencia, se observó un aumento de la replicación del ZIKV *in vitro*. Es importante destacar que estos resultados también se confirmaron en un modelo murino (cepa SJL) *in vivo* [99]. La inhibición farmacológica de AHR con CH223191 o con HP163 (un antagonista de AHR de segunda generación), resultó en una reducción de la replicación de ZIKV y mejoró la microcefalia del recién nacido en el modelo murino [99].

El estudio de ZIKV en el contexto de AHR ha sido abordado en nuestro laboratorio. Dicho trabajo, contiene los resultados que pusieron en evidencia el rol crucial que desempeña AHR durante una infección por ZIKV en modelos *in vitro* e *in vivo*, y constituyen el pilar fundamental que dio origen al tema, hipótesis y objetivos de mi tesis doctoral.

	IAV Virus de la Influenza A	AHR: Rol pro-viral . Aumenta la replicación viral y promueve el desarrollo de cuadros clínicos más severos.
	ZIKV Virus Zika	AHR: Rol pro-viral . Aumenta la replicación viral y promueve el desarrollo de cuadros clínicos más severos.
	HCV Virus de la Hepatitis C	AHR: Rol pro-viral . Aumenta el ensamble y replicación viral.
	HSV-1 Virus Herpes Simplex tipo 1	AHR: Rol controversial. La mayoría de los estudios indican que AHR presenta un rol pro-viral . La activación de AHR promovería una mejora en el cuadro clínico.
	HCMV Citomegalovirus humano	AHR: Rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	EBV Virus Epstein Barr	AHR: Rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	HHV-8 Herpes virus humano tipo 8.	AHR: Rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	HPV Virus del papiloma humano	AHR: Rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	HIV-1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana-tipo 1.	AHR: Rol controversial. La mayoría de los estudios indican que AHR presenta un rol pro-viral , sin embargo un trabajo sugiere un rol anti-viral .
	SARS-CoV2 Coronavirus del Síndrome respiratorio agudo severo- tipo 2	AHR: Rol pro-viral . Aumenta la replicación viral y promueve el desarrollo de cuadros clínicos más severos.
	CB3 Virus Coxsackie B3	AHR: Rol anti-viral . Disminuye la replicación viral.
	JUNV Virus Junín	AHR: rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	MHV Coronavirus murino. Virus de la hepatitis murino	AHR: rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	CCoV Coronavirus canino	AHR: rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	BHV1 Virus herpes bovino tipo 1	AHR: rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	RCMV Citomegalovirus de rata	AHR: rol pro-viral . Aumenta la replicación viral.
	NDV Virus de la enfermedad de Newcastle	AHR: rol anti-viral . Disminuye la replicación viral.

Tabla 2. Rol de AHR durante infecciones por virus.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

El virus dengue (DENV) activa la vía de señalización del receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) como mecanismo de evasión al sistema inmune.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

1. Demostrar el rol pro-viral o anti-viral de AHR durante una infección *in vitro* por DENV.
2. Explorar la posible interacción de AHR con el factor de restricción viral PML.
3. Investigar la posible interacción de AHR con el factor pro-viral Axl.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS

1. Células

• A549

Línea celular de epitelio basal alveolar originada a partir de adenocarcinoma pulmonar humano. Dentro de sus características se puede mencionar que esta línea celular es susceptible a la infección con flavivirus (DENV, ZIKV, etc) y la misma presenta una robusta respuesta de interferón (IFN) frente a los mismos. Las células fueron cultivadas en medio Eagle/ esencial mínimo (MEM, GIBCO) complementado con 5% de suero de ternera (GIBCO) y suplementado con 1mM de piruvato de sodio (Sigma), 2mM de L-glutamina (GIBCO) una mezcla buffer compuesta por HCl/NaHCO₃ y con 50µg/ml de gentamicina. Las células fueron cultivadas y mantenidas a 37°C en presencia de un 5% de CO₂. Las A549 fueron empleadas para la mayoría de los procedimientos experimentales llevados a cabo durante el desarrollo de la tesis doctoral.

• C6/36 HT

Línea celular proveniente de larvas de *Aedes albopictus* adaptada a crecer a 33°C. El medio de cultivo de elección para estas células es medio L-15 (Leibovitz, GIBCO) complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB, Sigma) y suplementado con 0,3% de caldo triptosa fosfato, 0,02% de glutamina, 1% de solución de aminoácidos no esenciales MEM (GIBCO), 50µg/ml de gentamicina. Las C6/36 HT fueron empleadas para la preparación de stocks virales.

• Hek293T

Línea celular proveniente de tejido embrionario de riñón humano. Esta línea celular es susceptible a la infección con DENV y la misma, presenta una robusta respuesta de interferón (IFN) frente a infecciones virales y una adecuada tasa de transfección. Las células fueron cultivadas en medio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) complementado con 5% de suero de ternera recién nacida (Gibco). asimismo, el medio fue suplementado con 50µg/ml de gentamicina, HCl y NaHCO₃. Las células fueron cultivadas y mantenidas a 37°C en presencia de un 4-5% de CO₂. Las Hek293T fueron empleadas para gran parte de los procedimientos experimentales llevados a cabo durante el desarrollo de la tesis doctoral en el capítulo III.

• ***U2OS***

Línea celular proveniente de osteosarcoma humano. Las U2OS son el modelo celular empleado para el estudio de la proteína de la leucemia promielocítica (PML), proteína cuyo estudio es abordado en el capítulo II de esta tesis doctoral. Dentro de sus cualidades cabe destacar que esta línea celular presenta una adecuada tasa de transfección. Las células fueron cultivadas en medio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) complementado con 5% de suero de ternera recién nacida (Gibco). Las células fueron cultivadas y mantenidas a 37°C en presencia de un 4-5% de CO₂. Las U2OS fueron empleadas para gran parte de los procedimientos experimentales llevados a cabo para el estudio de PML y AHR.

• ***Vero***

Línea celular de epitelio renal originada a partir de tejido proveniente de mono verde africano adulto. Esta línea celular cuenta con un defecto genético natural que les impide producir IFN de tipo I (IFN α , β). Estas células son susceptibles a la infección por una gran variedad de virus y su incapacidad de secretar IFN de tipo I las hace especialmente interesantes para el estudio de la relevancia de dicha vía de señalización. Las células fueron cultivadas en medio Eagle/ esencial mínimo (MEM, GIBCO) complementado con 5% de suero de ternera (GIBCO) y suplementado con 1mM de piruvato de sodio (Sigma), 2mM de L-glutamina (GIBCO) una mezcla buffer compuesta por HCl/NaHCO₃ y con 50 μ g/ml de gentamicina. Las células fueron cultivadas y mantenidas a 37°C en presencia de un 5% de CO₂. Las Vero fueron empleadas principalmente para realizar los ensayos de titulación viral por medio de la técnica estándar de formación de placas de lisis celular bajo metilcelulosa y asimismo, fueron empleadas en experimentos destinados a evaluar la importancia de la vía de IFN de tipo I.

• ***Monocitos humanos***

Cultivo primario de monocitos humanos (hMo) CD14⁺ provenientes de sangre entera de donantes sanos. Los hMo fueron aislados y purificados a partir de células mieloides de sangre periférica (periferic blood myeloid cells, PBMCs) haciendo uso de gradientes de Ficoll para el aislamiento de los PBMCs seguida de una purificación de los hMo CD14⁺ haciendo uso de *beads* magnéticas y un subsecuente *sorting* de las mismas. Los procedimientos de recepción de las muestras humanas, aislamiento de PBMCs y purificación de hMo CD14⁺ fueron realizados por el grupo del Dr. Eugenio Antonio Carrera-Silva del Instituto de Medicina Experimental (IMEX) de la Academia Nacional de Medicina (ANM), con quién recientemente establecimos una colaboración en el marco del proyecto de investigación abordado en el capítulo III de esta tesis doctoral. Una vez aislados y purificados los hMo

CD14+, los mismos fueron resuspendidos en solución fisiológica y mantenidos en hielo para el traslado a nuestro instituto. Posteriormente, se procedió a centrifugar las células a 300g (300rcf) por lapso de 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió cuidadosamente las células en 1ml de medio fresco a temperatura ambiente. El medio empleado para la resuspensión y para el cultivo de los hMo fue RPMI complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) GIBCO inactivo y suplementado con penicilina-estreptomicina. Tanto las células como los medios empleados fueron provistos por el grupo del Dr. Carrera Silva. La preparación de microplacas para la realización de los ensayos con hMo se realizó sembrando 100.000-150.000 células/ pocillo en microplacas de 96 pocillos y 150.000-200.000 células/ pocillo en microplacas de 48 pocillos que ya contenían en su interior vidrios para realizar posteriormente ensayos de inmunofluorescencia. Una vez realizada la siembra de las células, se procedió a incubar las mismas por 16-24h a 37°C en atmósfera con 4-5% de CO₂. Luego de 16-24h de adherencia se procedió a comenzar los procedimientos experimentales.

3. Stocks virales

La obtención de los stocks virales se realizó infectando la línea celular de mosquito C6/36 y cosechando el sobrenadante de los cultivos a diferentes tiempos pi. Para el desarrollo experimental se partió de un cultivo de C6/36 en el que la monocapa de células se encontraba en estado confluyente en botellas T25. El primer paso consistió en retirar el medio Leibovitz con 10% de SFB que contenían las células. Luego de la remoción del medio, se procedió a inocular 500µl de un stock de: DENV-1, cepa HW (Hawaii); DENV-2, cepa (New Guinea C, NGC); DENV-2, cepa Thailand/16681/1984; DENV-3, cepa Philippines/H87/1956; DENV-4, cepa aislamiento 8124. A continuación, las células se incubaron durante 60 min a 33°C para la adsorción viral. Posteriormente se retiró el inóculo viral y se reemplazó por 6ml de medio Leibovitz fresco con 2% de SFB. Finalmente se incubó la botella durante una semana a 33°C.

La cosecha de los stocks se realizó desde el tercer día (3dpi) al séptimo día (7dpi) y consistió en guardar el sobrenadante de cultivo a -80°C e incorporar 6ml de medio fresco al cultivo luego de la cosecha. Cabe destacar que cada cosecha se realizando reservando 50µl de muestra para realizar la titulación viral. En la figura 7 se dispusieron micrografías correspondientes a microscopia óptica de campo claro en la que se puede observar la evolución de la infección en cultivos de C6/36 HT infectados con DENV-2 para producir stock viral.

NOTA: todos los procedimientos experimentales que implicaron el trabajo con virus y la manipulación de muestras infectadas se llevaron a cabo con estrictas normas de bioseguridad y trabajando en cabinas de bioseguridad nivel II(BSLII).

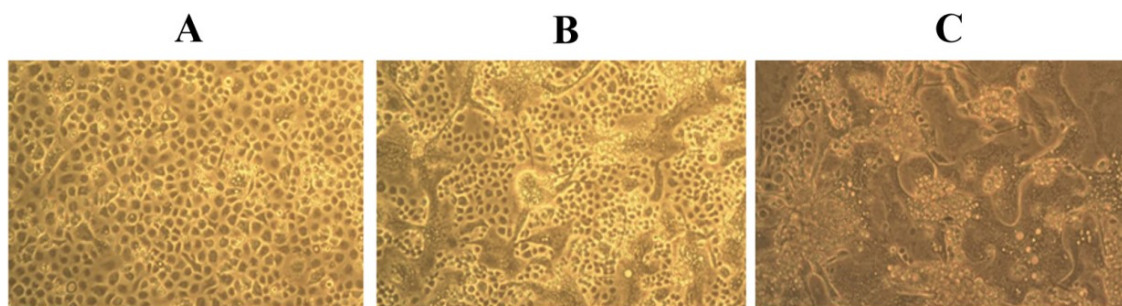


Figura 7. Línea celular C6/36 HT en las condiciones no infectada(A), quinto día post-infección (B) y sexto día post-infección (C) con DENV-2-. En las figuras B y C, se observa la formación de los sincicios característicos de este tipo de infección. Aumento de 10X.

3. Drogas empleadas

Las drogas de elección son compuestos capaces de modular la actividad del AHR : indoxilo sulfato de potasio o I3S (Sigma) y L-kynurenina (Sigma) que tienen capacidad de actuar como un agonista del receptor en cuestión y por otro lado, CH223191(Tocris Bioscience) que es un antagonista específico del AHR. La preparación de los stocks se realizó por resuspensión de la droga sólida en dimetilsulfóxido (DMSO).En el caso de I3S y kynurenina, las alícuotas fueron guardadas a -20°C, mientras que en el caso del antagonista, las mismas se conservaron a -80°C. Se tomó especial recaudo en proteger dichas drogas de la luz debido a que las mismas son fotosensibles.

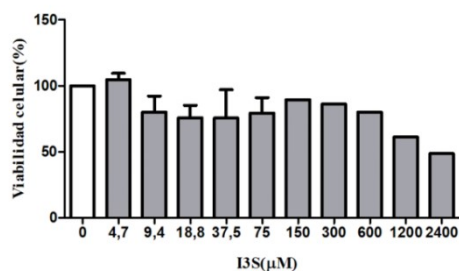
Por otro lado, se empleó R428 (Abcam), que es un antagonista selectivo de Axl. El mismo fue resuspendido en DMSO. Por otro lado se empleó poly I:C (Sigma) resuspendido en agua destilada estéril.

MÉTODOS

1. Citotoxicidad de drogas

Ensayo de citotoxicidad por el método de cristal violeta. La elección del rango de concentración de las drogas a utilizar se realizó evaluando la viabilidad de los cultivos celulares por microscopía óptica frente a diferentes concentraciones de los compuestos que se deseaban ensayar.Los rangos de concentraciones elegidos para cada droga fueron: 50-600μM en el caso de I3S y de 2-33μM para CH223191.

A. Agonista



B. Antagonista

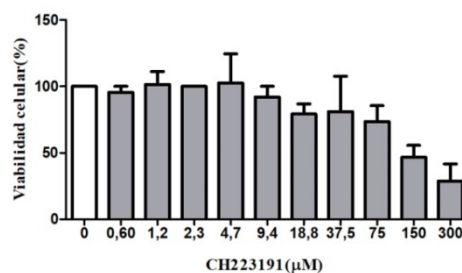


Figura 8. Citotoxicidad de drogas moduladoras de AHR. Cultivos de A549 fueron tratados por 48h con distintas concentraciones de I3S ó de CH223191. El método elegido para la evaluación de la viabilidad celular fue el método del cristal violeta. Se grafica el porcentaje de viabilidad celular.

2. Titulación viral

Para comenzar se sembraron células Vero de modo que la monocapa de células se encuentre entre un 75-95% de confluencia al momento de realizar la titulación. El primer paso consistió en descongelar las muestras en hielo y preparar diluciones seriadas (1/10) en PBS estéril de las muestras a evaluar. Las diluciones se mantuvieron en frío hasta ser inoculadas. Luego, se retiró el medio de cultivo que contenían las células, se procedió a inocular 200μl/pocillo de cada dilución realizada y se incubaron las células durante 60 min a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, procurando agitar la microplaca cada 15 min para evitar la sequedad de los pocillos y distribuir el inóculo viral en forma homogénea en toda la superficie del mismo. Una vez transcurrida la hora de adsorción, se retiró la suspensión viral de cada pocillo y se reemplazó por 1ml de medio MEM con metilcelulosa al 1%.

Finalmente se incubó la microplaca durante una semana a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Por último, se fijaron las células con formol al 10%, se tiñeron con cristal violeta y se procedió a realizar el recuento de las placas de lisis en cada pocillo. El título viral se definió como (UFP/ml).

3. Extracción de ARN

La recolección de muestras para PCR se realizó cosechando las mismas en TRIzol (R) (Invitrogen) y el protocolo de extracción de ARN se realizó de acuerdo al manual de uso del reactivo recomendado por el fabricante.

Brevemente, se procedió a descongelar las muestras a procesar a temperatura ambiente y luego del descongelamiento se mezclaron con vortex por unos seg. Luego, se colocaron 200μl/muestra de cloroformo frío (calidad analítica, Merck), se mezcló 3 veces por inversión y se incubó las muestras en hielo por 3 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 14.000g(rcf) por 15 min a 4°C.

Consecutivamente, se tomó cuidadosamente la fase acuosa (incolora) del tubo y se lo colocó en un tubo nuevo. Luego, se colocó 375µl/muestra de isopropanol frío (calidad analítica, Merck), se mezcló 3 veces por inversión cada tubo y se incubaron las muestras en hielo por lapso de 10 min. El siguiente paso consistió en volver a centrifugar las muestras a 14.000g(rcf) por 10 min a 4°C. Transcurrida la centrifugación, se removió cuidadosamente el sobrenadante y se descartó. A continuación, se resuspendió el sedimento en 750µl-1000µl/muestra etanol al 75% (calidad analítica, Merck), se mezcló adecuadamente por pipeteo y con vortex por unos seg y se procedió a centrifugar las muestras 14.000g(rcf) por 5 min a 4°C. Posteriormente, se removió cuidadosamente el sobrenadante y se volvió a resuspender el sedimento en 750µl-1000µl/muestra etanol al 75%, se mezcló adecuadamente por pipeteo y vortex y nuevamente se centrifugaron las muestras 14.000g(rcf) por 5 min a 4°C. Este segundo paso de lavado permitió obtener muestras de ARN de mejor calidad analítica por contener menos concentración de solventes.

Finalmente, se removió el sobrenadante por completo, se dejó evaporar el remanente de solvente a temperatura ambiente y se procedió a resuspender el extracto en 30-40µl de H₂O libre de RNAasa. Adicionalmente, se alicuotaron 2µl de cada muestra en tubos nuevos para realizar la cuantificación de la concentración de ARN y para evaluar la calidad del mismo por Nanodrop (ThermoFisher). Las muestras de ARN se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

3. Síntesis de cDNA

Para comenzar se procedió a descongelar y reservar las muestras de ARN en hielo. A continuación se preparó una mezcla de dNTPs (10mM) conteniendo cantidades iguales de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Consecutivamente, se preparó la mezcla de reacción, que para cada muestra contiene: 1µl de enzima MMLV RT(200UI, Promega), 5µl buffer 5X de la enzima, 2,5µl de la mezcla de dNTPs (10mM) y 1,5µl de H₂O libre de RNAasa y DNAasa. La mezcla de reacción se homogeneizó adecuadamente por pipeteo y vortex y se reservó en hielo hasta ser utilizada. Por otro lado, se procedió a preparar las muestras: se colocó en un tubo nuevo 500ng de ARN (muestra a amplificar), 1,2µl de random primers (20µg/µl, Genbiotech) y el volumen de H₂O libre de RNAasa y DNAasa necesaria para que el volumen final del tubo de reacción sea 10µl, por muestra. Luego, se mezclaron correctamente los componentes del tubo conteniendo la muestra por pipeteo y vortex y consecutivamente se incubó a 70°C por lapso de 5 min en un termobloque. Transcurrida la incubación, se colocaron los tubos con las muestras en hielo por 5 min. A continuación, se volvió a homogeneizar por vortex la mezcla de reacción, se procedió a adicionar 10µl de la misma por muestra de modo que el volumen final del tubo de reacción sea 20µl. Luego, se mezcló bien el contenido del tubo por

pipeteo/vortex y se dejó en hielo hasta que el termobloque a utilizar alcanzara los 42°C. Se realizó la incubación de las muestras con la mezcla de reacción a 42°C por 2h en un termobloque. Finalmente se guardó el cDNA resultante a -20°C.

5. RT-PCR cuantitativa y primers utilizados

Se empleó la SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) fue utilizada. La mezcla de reacción consistió en 1µl de cDNA, DNA polimerasa GoTaq (5U/µl, Promega) y primers específicos para amplificar los genes de interés. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25µl. Los pares de primers utilizados fueron los siguientes:

(1) *β-actina* (sentido: 5'- TTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3'; antisentido: 5'- TCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3')

(2) *ahr* (sentido: 5'-ATCCTTCCAAGCGGCATAGAGACC-3'; antisentido: 5'- CAAAGAAGCTCTTGGCTCTCAGG-3')

(3) *cyp11a1* (sentido: 5'- GAACTGCTTAGCCTAGTCAACCTG-3'; antisentido: 5'-AGAATAGGGATGAAGTCAGCTGGG-3')

(4) *cyp11b1* (sentido : 5'- AACACCTCTGTCTTGGGCTACCAC-3'; antisentido: 5'-TGGGTCATGATTCACAGACCACTGG-3')

(5) *axl* (sentido 5' GTGTCAGCTCCAGGTTTCAGG 3' ; antisentido 5' GCAGGGAGGTGATTCTGAGC 3')

(6) *pml* (sentido 5' -TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC-3' ; antisentido 5'- GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCT-3')

Los detalles del ciclo de PCR son los siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de amplificación constantes de 30 seg a 95°C, apareamiento a 58 °C durante 1 minuto, elongación a 72 °C durante 1 minuto y un ciclo final de 10 min a 72 °C. La detección se realizó utilizando un iCycler de Bio-Rad con el sistema de detección de RT-PCR MyiQ2 de dos colores (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.). Los gráficos de amplificación se analizaron con el software Opticon Monitor 3.1 y se utilizó el método comparativo de ciclo umbral (comparative threshold, Ct) para determinar la expresión génica relativa respecto al gen de referencia celular elegido: *β-actina*.

6. Citometría de flujo (FACS)

Los ensayos destinados a recolectar muestras para citometría de flujo (FACS) se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos de fondo plano y en las mismas se procedió a realizar la siembra de células A549 (de modo de poseer una confluencia de un 90% al

momento del ensayo) o se sembraron entre 100.000-150.000 monocitos humanos (hMo)/pocillo. Una vez llevado a cabo el ensayo, se realizó la cosecha de las muestras. En principio, se colocó la microplaca por 15min en hielo, posteriormente se removieron los sobrenadantes, y se agregó 100µl /pocillo de una solución de PBS con 2% de SFB y EDTA 2mM. Se incubó la microplaca por 20 min en hielo y se cortó la reacción por adición de 100µl/pocillo de PBS con 2% SFB. Se mezcló suavemente por pipeteo y se comenzó a realizar el levantamiento de las células por pipeteo constante y suave durante 3 min por muestra. Las muestras fueron pasadas o bien a tubos limpios o bien a microplacas de 96 pocillos con fondo en V, de acuerdo al número de muestras a analizar. Una vez transferida cada muestra, se colocó PBS en cada pocillo, y se corroboró bajo microscopio la correcta recolección de todas las células de la monocapa. A continuación, se realizó una centrifugación a 800g por 3min a 4°C, se descartaron los sobrenadantes con precaución de no remover el precipitado celular y se resuspendió cada muestra celular en 200µl/tubo(o pocillo) de PBS con 2% SFB. Se mezcló hasta homogeneizar por pipeteo y se volvió a centrifugar a 800g por 3min a 4°C. Luego, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendió cada precipitado celular en 50µl/tubo de colorante de viabilidad Zombie Violet (1:1000 en PBS). Las muestras se incubaron en ausencia de luz y en hielo por lapso de 30min. Posteriormente, se realizó un lavado con 150µl/tubo de PBS y nuevamente se centrifugó las muestras a 800g por 3min a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y se fijaron las células con 100µl/tubo de una solución al 1% de paraformaldehído (PFA 1%). La fijación se llevó a cabo en ausencia de luz y en hielo por lapso de 20min. A continuación se lavaron las células con 100µl/tubo de PBS y se centrifugó las muestras a 800g por 3min a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes, se repitió este proceso de lavado una vez más y finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados celulares en 200µl/tubo de PBS con 2% de SFB. Las muestras fueron guardadas a 4°C, bien selladas para evitar la evaporación y a resguardo de la luz hasta ser procesadas por FACS.

El procesamiento de muestras por citometría de flujo fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Antonio Carrera Silva en el IMEX. El protocolo utilizado se detalla a continuación.

Para todas las muestras se emplearon anticuerpos debidamente combinados y dirigidos hacia los siguientes antígenos humanos de membrana e intracelulares: Axl biotinilado (R&D Biosystems), Gas6 (de *conejo antiGas6 humano* ;Abcam). HLA-DR(Biolegend), CD86 (Biolegend), CD40(Biolegend). Como anticuerpos secundarios se utilizaron estreptavidina Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 488, y de *burro anti-conejo* Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 647 (Biolegend). Para discriminar las células muertas de las vivas se empleó el una dilución 1/1000 del colorante de viabilidad Zombie Violet (Biolegend).

En todas las marcaciones de antígenos de superficie realizadas las células fueron resuspendidas en PBS con 5% de SFB para bloquear las interacciones inespecíficas mediadas por la fracción constante del anticuerpo (Fc), durante 15 min a 4°C previo a la tinción. A continuación, las células fueron lavadas, y e incubadas con los anticuerpos correspondientes diluidos en PBS con 2% de SFB. Las incubaciones fueron de 30 min a 4°C y en oscuridad. Las células se resuspendieron en PBS para ser analizadas en el citometro de flujo, o bien se permeabilizaron con Perm Wash (BD Biosciences) durante 20 min a 4°C, se bloquearon nuevamente con PBS con 5% de SFB y luego se realizaron las incubaciones con los anticuerpos para marcas intracelulares 30 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células marcadas se lavaron, se resuspendieron en 200 µl de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo empleando un citometro FACS Canto I, [Becton Dickinson, Instituto de Investigaciones Biomedicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Facultad de Medicina, UBA] o PartecCyFlow Cube 8 (Sysmex, IMEX, Academia Nacional de Medicina). Los datos resultantes de la citometría de flujo fueron analizados con el software FlowJo v10, LLC.

7. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

El procedimiento experimental fue realizado a partir de las muestras previamente fijadas con metanol por lapso de 10 min a -20°C ó con PFA 4% entre 10-30min a temperatura ambiente. Una vez removido el fijador, las células fueron lavadas 2-3 veces con PBS y guardadas a 4°C en PBS fresco estéril hasta su procesamiento.

Para comenzar, se lavaron los vidrios en que estaban fijadas las muestras con PBS fresco durante 5 min a 120-130rpm a temperatura ambiente, se descartó el PBS utilizado para el lavado y se puso a las células en contacto con el anticuerpo primario; un anticuerpo monoclonal de ratón (modelo 9202, Abcam) que es capaz de reconocer el antígeno E viral (anti-E), o anti-AHR (de conejo anti AHR humano) (GeneTex; dilución 1:100) o anti-PML (de ratón anti PML humano clon E11; dilución 1:25). Se hizo uso de 20µl de una dilución en PBS 1/300 del anticuerpo anti-E. Se Incubó los vidrios por lapso de 60 min a temperatura ambiente. Luego, se lavaron los con PBS fresco durante 5 min a 120-130rpm a temperatura ambiente; este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, se colocó el anticuerpo secundario: un anticuerpo capaz de reconocer IgG de ratón (anti-IgG-ratón) que se encuentra conjugado a un fluorocromo (Alexa 488; Invitrogen). Se hizo uso de 20µl de una dilución en PBS 1/300 del anticuerpo y éste, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS fresco durante 5 min a 120-130rpm a temperatura ambiente y finalmente, se realizó el marcado de los núcleos celulares con 20µl de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que fue utilizado en una dilución 1/1000 y que se dejó tiñendo durante 5 min a temperatura ambiente, a oscuras y luego se realizaron

tres lavados con PBS fresco durante 5 min a 120-130rpm a temperatura ambiente. Por último, se realizó el montaje de los cubreobjetos en un portaobjetos con 3µl de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO) al 2,5%. Cuando el protocolo fue llevado a cabo durante una pasantía en Alemania las muestras se montaron empleando ProLong GOLD con DAPI.

ID	Antígeno	Especie y clonalidad	Dilución	Marca
1	Proteína de envoltura E de flavivirus	Raton, monoclonal	1:300	Abcam
2	AHR humano	Conejo, policlonal	1:50	GeneTex
3	Pan-PML	Raton, monoclonal	1:25	Santa Cruz Biotechnology
4	Nucleolina	Humano, suero 11	1:200	Disponible en FLI

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en IFI.

8. Transfección

La misma fue llevada a cabo siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante de cada kit de transfección empleado. En el caso de los ensayos realizados con motivo de expresar en forma exógena AHR y PML, se empleó la línea celular U2-OS y el reactivo de transfección seleccionado fue FuGENE. La transfección se realizó por 24h y posteriormente se procedió a fijar los cultivos transfectados y procesar para IFI. En el caso de los ensayos realizados con plásmidos reporteros del promotor de Axl, cultivos celulares de Hek293T fueron co-transfectados con un plásmido reportero del promotor de Axl (Axl-promotor-luciferasa) y con un plásmido control y utilizando Lipofectamina 2000 (ThermoFisher) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

9. Plásmidos empleados para la expresión exógena de AHR y PML

Los plásmidos empleados para llevar a cabo la expresión exógena de las distintas isoformas de PML (I-VI) fusionadas a la proteína roja fluorescente monomérica (red fluorescent protein, RFP, rfp), fueron gentilmente provistas por el Dr. Peter Hemmerich del Core Facility Imaging (CFI), Fritz Lipmann Institute (FLI) de Jena, Alemania. Los plásmidos fueron creados a partir del reemplazo de una secuencia de ADN codificante para la proteína verde fluorescente (enhanced green fluorescent protein, eGFP) por la secuencia de ADN codificante de RFP en un plásmido que ya contenía dicha marca verde fluorescente fusionada a PML (I-VI). El clonado de RFP en el plásmido, fue realizado mediante la utilización de los sitios únicos de restricción AgeI y BsrGI en los plásmidos eGFP-PML originales. En la Figura 9 se puede observar los mapas de los plásmidos rfp-PML I,III,IV,V y VI utilizados en esta tesis doctoral.

El plásmido codificante para AHR (pEGFP-C1-hAHR, EGFP-AHR) presentaba la secuencia del AHR humano fusionada a la proteína fluorescente verde (enhanced green

fluorescence protein, EGFP). El mismo, fue gentilmente obsequiado por el Dr. Gordon Hager cuyo laboratorio pertenece al National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, EE.UU. El mapa del plásmido descrito en [127] se puede observar en la Figura 9.

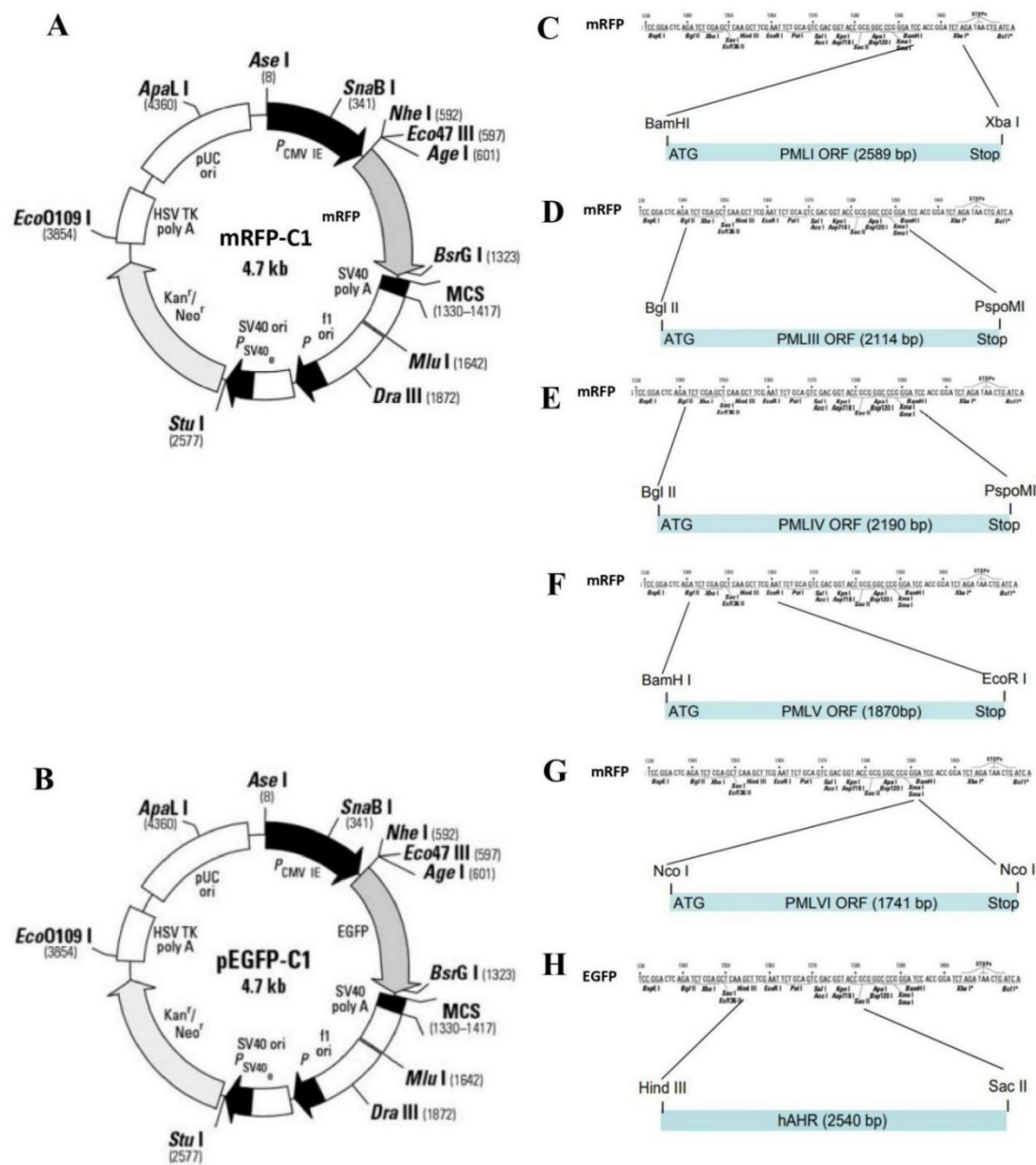


Figura 9. Mapa de los plásmidos empleados para la expresión exógena de PML y AHR. (A) Plásmido en el que fueron clonados las secuencias de ADN codificantes para (C) PML I, (D) PML III, (E) PML IV, (F) PML V y (G) PML VI. (B) Plásmido en el que fue clonada la secuencia de ADN codificante para (H) AHR humano. Esta Figura fue organizada y adaptada con fines ilustrativos para esta tesis doctoral, a partir de información disponible en los trabajos de Weidtkamp-Peters et al.2008 y Elbi et al., 2002.

10. Microscopía y microscopios empleados

Se emplearon los siguientes microscopios:

- a) Microscopio de fluorescencia Olympus BX61.IQUIBICEN-UBA-CONICET
- b) Microscopios ApoTome V y ApoTome VI (Zeiss). Sistema Axiovert 200 ApoTomes; 2x invertido, 3x upright (seccionamiento óptico con iluminación estructurada, análisis de co-localización, 2D, 3D, mediciones de distancia, mosaico de secciones de tejido). CFI-FLI,Jena,Alemania.
- c) Microscopio Leica TCS SP8 STED-3X (Microscopía de superresolución de emisión estimulada).CFI-FLI,Jena,Alemania.

11. Análisis y cuantificación de imágenes

El análisis de imágenes se llevó a cabo haciendo uso del siguiente diagrama de flujo para asegurar una evaluación objetiva y equivalente para todas las muestras (Figura 10).

Para la **cuantificación del número y tamaño de PML-NBs** por célula, a partir de cada Z-stack de cada condición, se procedió a generar proyecciones de intensidad máxima (maximum intensity projections, MIP) empleando el software Zen Blue 3.2 Lite. Para ello, se empleó la herramienta que permitía definir el diámetro de cada PML-NB y de acuerdo a su tamaño se procedía a contarlos o no. Dicho procedimiento se realizó manualmente, registrando para cada PML-NB de cada núcleo de cada célula el diámetro y asignándole a cada PML-NB una identidad (Figura 10).

Para la **cuantificación de la intensidad media de fluorescencia**, a partir de cada Z-stack de cada condición, se procedió a generar proyecciones de intensidad intermedia (average intermediate projections, AIP) empleando el software FIJI. Una vez producidas las AIP, se realizó la cuantificación de intensidad media de fluorescencia (IMF). Para ello, se empleó la herramienta de selección libre de FIJI, para la determinación manual de la fluorescencia en citoplasma y en la célula total, para cada célula y cada imagen. Cabe destacar que para evitar solapamiento de medidas entre célula y célula, en el caso de existir solapamiento de citoplasmas, se realizaba un seccionamiento manual, definiendo lo más rigurosamente posible la dimensión de cada célula, para no cuantificar por duplicado la fluorescencia y no atribuírsela a dos células en simultáneo (Figura 10).

Por otro lado, para la determinación de la IMF a nivel nuclear, se optó por realizar una cuantificación semiautomática de la IMF mediante la generación de una máscara binaria a partir de los núcleos de las células a cuantificar. Para ello, se partió de la AIP correspondiente y se realizó una separación de los canales de la imagen. Una vez obtenidas imágenes separadas del canal correspondiente a los núcleos (DAPI) y una por separado de la proteína a

cuantificar (AHR, canal verde), se procedió a armar la máscara binaria (MB) con la imagen de los núcleos.

Brevemente, el proceso consistió en tomar la imagen del canal de DAPI, pasarla escala de grises y duplicar imagen. A continuación, se siguió trabajando con la copia. Posteriormente se aplicó un filtro gaussiano de 0,5 para reducir ruido de fondo. Luego, se invirtieron los colores de la imagen y se utilizó la herramienta de control de brillo y contraste, para mejorar la definición pero sin aplicar el cambio para no modificar los pixels de la imagen. Consecutivamente, se seleccionó y aplicó un algoritmo para filtrar lo que deseo que corresponda a la máscara binaria, en este caso los núcleos. En esta tesis doctoral fue utilizado el threshold Huang, que es ampliamente utilizado para selección de núcleos. Con dicho filtro, se seleccionaron intensidades del umbral y se generó la máscara binaria (MB) cruda o primaria. Luego, se procedió a mejorar la MB para llenar posibles huecos y separar posibles núcleos que se encuentren solapados. Una vez determinado que la MB selecciona efectivamente núcleos separados, se hace uso de la herramienta para filtrar partículas de un rango compatible con núcleos celulares y producir el ROI manager (region of interest, ROI). Una vez creado el ROI manager, que en términos sencillos, constituye la plantilla con la que se procederá a analizar cada núcleo definido y que permite atribuir a cada célula una identidad, se selecciona la imagen a cuantificar y se aplica el ROI manager en esa imagen. En este punto, es importante corroborar que delimite los núcleos correctamente. Finalmente, se definen las variables a cuantificar, se mide y exportar los datos. Por último, se realiza mediciones de intensidad de fluorescencia del fondo (background) en al menos tres regiones que no presenten células, se promedian valores y restan de los valores de IMF para obtener valores corregidos. En la Figura 10 se diagrama el procedimiento mencionado y en la Figura 11 se visualizan las imágenes de los cambios que va atravesando la imagen utilizada para generar la máscara binaria y llegar al ROI manager aplicado en la imagen a cuantificar. Los software utilizados para el análisis de imágenes fueron variados: Zen Blue 3.2 Lite, FIJI y LAS X (para imágenes de microscopía STED de super resolución).

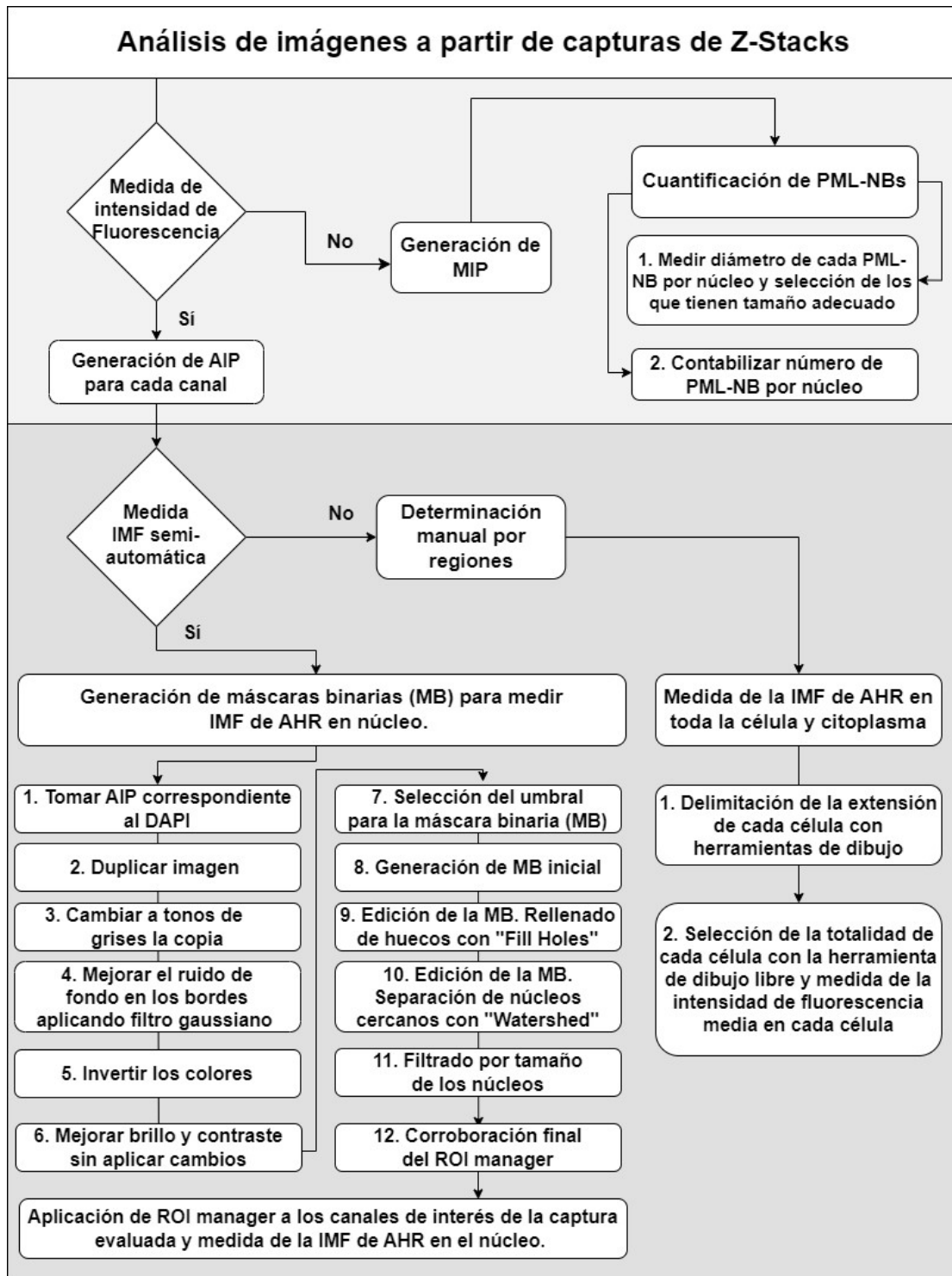


Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de análisis de imágenes.

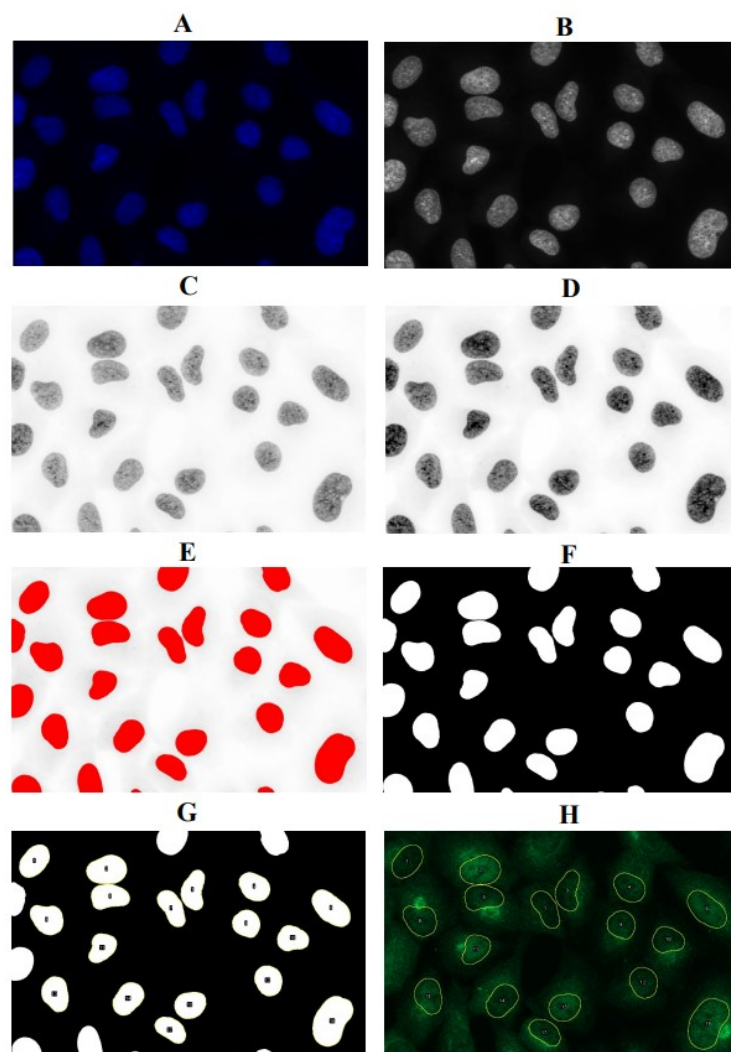


Figura 11. Cuantificación semiautomática de intensidad media de fluorescencia nuclear con FIJI. (A) Imagen del canal correspondiente a los núcleos de la figura a cuantificar. (B) Micrografía de núcleos en escala de grises luego de la aplicación del filtro gaussiano para reducir ruido de fondo e invertir colores de la imagen. (C) Imagen con los colores invertidos. (D) Micrografía con aumento de contraste sin aplicar el cambio para no modificar los pixels de la imagen. (E) Threshold Huang para selección de núcleos. (F) Aplicación del filtro Huang y creación de máscara binaria (MB). (G) MB mejorada, con filtrado de partículas y generación del ROI manager (se visualiza como línea amarilla que delimita núcleos). (H) Imagen del canal correspondiente a la proteína a medir, en este caso AHR (verde) con ROI manager incorporado y la selección de las regiones a cuantificar.

12. Estadística

Las diferencias entre los grupos analizados se comprobaron mediante una prueba T (T- test) two-sided ó One-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey (para comparar las medias de todos los tratamientos entre sí) o un ANOVA unidireccional seguido un post-test de Dunnet (cuando se comparan todas las medias con una media de control), como se indica en las leyendas de las figuras de cada experimento. Un valor $P < 0,05$ se consideró significativo.

DISEÑOS EXPERIMENTALES

1. Ensayos antivirales

El ensayo consistió en realizar una infección de un cultivo celular previamente tratado con diferentes concentraciones de las drogas a ensayar y al cabo de 24h ó 48h de infección realizar la recolección de las muestras a evaluar.

Para el desarrollo experimental, se prepararon microplacas de 24 pocillos en las que en cada pocillo se tenía un cultivo de células A549, en el que la monocapa de células se encontraba en estado confluyente. El primer paso consistió preparar las diluciones de las drogas a evaluar. Se realizaron diluciones de I3S en MEM suplementado con 50µl/ml de gentamicina, suero de ternero al 1,5% y una mezcla buffer de HCl y NaHCO₃. Las diluciones se mantuvieron en frío hasta ser administradas. Luego, se retiró medio de cultivo que contenían las células y se procedió a inocular 350µl de cada dilución realizada en los pocillos que se fueran a pre-tratar con agonista; en los pocillos restantes se colocaron 350µl del medio con el que realizaron las diluciones. Se incubó las células durante 24h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurridas 22h de tratamiento con agonista, se prepararon diluciones de CH223191 en MEM suplementado con 50µl/ml de gentamicina, 1,5% de suero de ternero y una mezcla buffer de HCl y NaHCO₃. En todo momento se mantuvo las diluciones en frío y en oscuridad. Posteriormente, se retiró y reservó el medio de cultivo que contenían las células y se procedió a dispensar 350µl de cada dilución realizada en los pocillos que se fueran a pre-tratar con antagonista. Se incubó las células durante 90 min a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación, se procedió a realizar la resuspensión del stock viral en medio MEM suplementado con 50µl/ml de gentamicina, suero de ternero al 1,5% y una mezcla buffer de HCl y NaHCO₃. La misma se preparó de modo que al dispensar 200µl por pocillo la multiplicidad de infección (MOI) fuera de 0,5. Una vez que ha transcurrido el tiempo de pre-tratamiento con el antagonista, se removieron y reservaron los sobrenadantes que contenían las diluciones de las drogas, se colocó en cada pocillo 200µl de la suspensión viral y se incubó las células durante 60 min a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, procurando agitar la microplaca cada 15 min para evitar la sequedad de los pocillos y distribuir el inóculo viral en forma homogénea en toda la superficie del pocillo. Finalmente, se removió la suspensión viral de cada pocillo y se reincorporaron los medios reservados previamente que contenían los tratamientos con agonista y antagonista. Se incubó la microplaca durante 24h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. La toma de muestra implicó la recolección de los sobrenadantes de los cultivos, que fueron guardados a -80°C hasta su procesamiento. Los mismos se emplearon para titulación viral por medio del método estándar de formación de placas de lisis bajo metil celulosa (UFP/ml). Por otro lado, a partir de cubreobjetos que contenían monocapas de

células pre-tratadas e infectadas, se practicaron inmunofluorescencia indirecta (IFI) y finalmente, a partir de las monocapas celulares levantadas con TRIZol, se realizó una RT-PCR en tiempo real.

NOTA: Para los ensayos destinados a procesarse por FACS, la MOI empleada para A549 fue de 0,01. Los ensayos con monocitos se realizaron mediante los mismos procedimientos experimentales, variando las drogas y recolectando al momento de la cosecha los sobrenadantes de los cultivos y cosechando las células para análisis por FACS y con una MOI=0,02.

2. Ensayos de expresión exógena de proteínas

Se llevó a cabo la transfección de codificantes para egfpAHR, rfpPML(I,III,IV,V y VI) y egfpNS5. Para ello, células U2OS fueron transfectadas con los plásmidos haciendo uso del reactivo FuGENE (Promega) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

3. Ensayos reporteros de actividad de promotor

Se procedió a realizar ensayos con un sistema reportero que permitiera evaluar el impacto de AHR sobre la expresión de Axl *in vitro*. Para ello, cultivos celulares de Hek293T fueron co-transfectados con un plásmido reportero del promotor de Axl (Axl-promotor-luciferasa) y con un plásmido control y utilizando Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de la transfección, las células fueron tratadas por lapso de 24h con moduladores de AHR y finalmente se realizó la medición de la luminiscencia. La actividad Luciferasa fue medida utilizando el sistema comercial BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (New England Biolabs) mientras que la actividad Renilla luciferasa fue determinada usando el kit Renilla Luciferase Assay System (Promega). Finalmente, la actividad Gaussia Luciferasa fue normalizada respecto de la de TK Renilla.

Plásmido	Marca	Catálogo
Ctrol-Luciferase (firefly) plasmid	Promega	Control: pGL4.54[luc2/TK] Vector E506A
Axl promoter-Luciferase (gaussia) plasmid	GeneCopoeia	HPRM43823-PG02

Tabla 4. Plásmidos empleados en ensayos reporteros de actividad de promotor de Axl.

Resultados

Capítulo I

**Demostrar el rol pro-viral o anti-viral de
AHR durante una infección *in vitro*
por DENV**

Capítulo I

RESULTADOS

CAPÍTULO I

RESULTADOS

1. *DENV activa la vía de señalización de AHR durante la infección*

El primer paso para el estudio de la relevancia de la vía de señalización de AHR durante una infección por DENV consistió en evaluar el estado de la vía de AHR durante la infección. Para ello, células A549 fueron infectadas con DENV-2 (MOI=0,5). Luego de 24h post-infección (hpi), las células fueron cosechadas para procesar por RT-qPCR y se determinó los niveles de ARNm de AHR y de CYP1A1, que es un gen blanco canónico de AHR. Dado que AHR es un factor de transcripción, uno de los métodos para la determinación de su actividad consiste en evaluar la expresión de al menos uno de sus genes blanco.

Los resultados obtenidos indican que células infectadas con DENV-2 presentan un aumento de la expresión del ARNm de AHR y de CYP1A1, a 24hpi (Figura 11). Estos resultados constituyen la primera evidencia que demuestra que la vía de señalización de AHR se encuentra activada durante una infección por DENV.

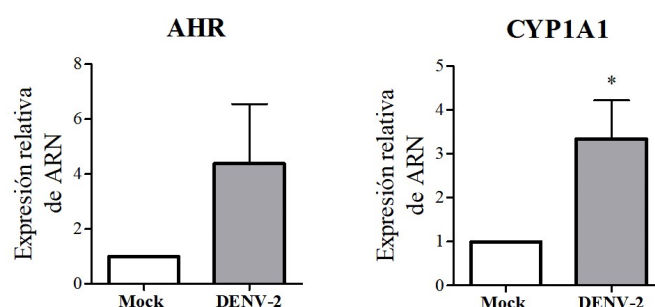


Figura 11. La vía de AHR se encuentra activada durante la infección por DENV. Células A549 fueron inoculadas con vehículo (mock) o con DENV-2- (MOI=0,5). Luego de 24h se cosecharon las muestras de monocapas celulares para procesarse por RT-qPCR. Se determinaron β -actina, AHR y CYP1A1. Se graficó la media $\pm$ SEM del cambio total de ARN respecto del control de tres ensayos independientes (veces de cambio). El análisis estadístico se llevó a cabo por T-test no apareado de dos colas con un intervalo de confianza del 95%. p valor $<0,05$.

2. *DENV aumenta la expresión de AHR durante la infección y promueve su translocación del citoplasma al núcleo*

El siguiente paso de nuestra investigación consistió en la evaluación del impacto de la infección por DENV en los niveles de expresión de AHR a nivel de proteína. Este estudio se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el laboratorio del Dr. Peter Hemmerich del Core Facility Imaging (CFI), Fritz Lipmann Institute-Leibniz Institut für Alternforschung, Jena, Alemania.

En primer lugar se llevó a cabo la optimización de la marca de AHR para su detección en células A549 en condiciones basales; sin presencia de infección. Cabe destacar que este paso fue fundamental. Nos permitió no sólo definir las mejores estrategias de tinción para IFI y determinar el estado de AHR en condiciones basales, sino que además, hasta el momento en nuestro laboratorio no había sido posible poner a punto la detección de AHR con distintos anticuerpos empleados anteriormente (*Ver sección materiales y métodos*). Una vez definidas las condiciones óptimas de tinción, se procedió a investigar el comportamiento de AHR durante la infección. Con motivo de evaluar los niveles de expresión proteicos y el tráfico celular del AHR durante la infección, células A549 fueron inoculadas con medio (mock) o infectadas con DENV-2 (MOI =0,5). Al cabo de 24h, las células fueron fijadas y procesadas por inmunofluorescencia indirecta. A partir de cada muestra, se adquirieron capturas de Z-stacks con el microscopio ApoTome VI (Zeiss).

Para comenzar, se observó que células infectadas con DENV-2 no sólo presentan mayores niveles de intensidad media de fluorescencia (IMF) de AHR (Figura 13 A-B), sino que también muestran mayores niveles de IMF en el núcleo (Figura 14). Teniendo en consideración que la IMF es directamente proporcional al contenido proteico de AHR, estos resultados indican que células infectadas con DENV-2 exhiben un aumento de AHR a nivel de proteína a 24hpi. Asimismo, los resultados obtenidos describen que DENV es capaz de desencadenar el desplazamiento núcleo-citoplasma a 24hpi, observado como un aumento de IMF a nivel nuclear (Figura 14).

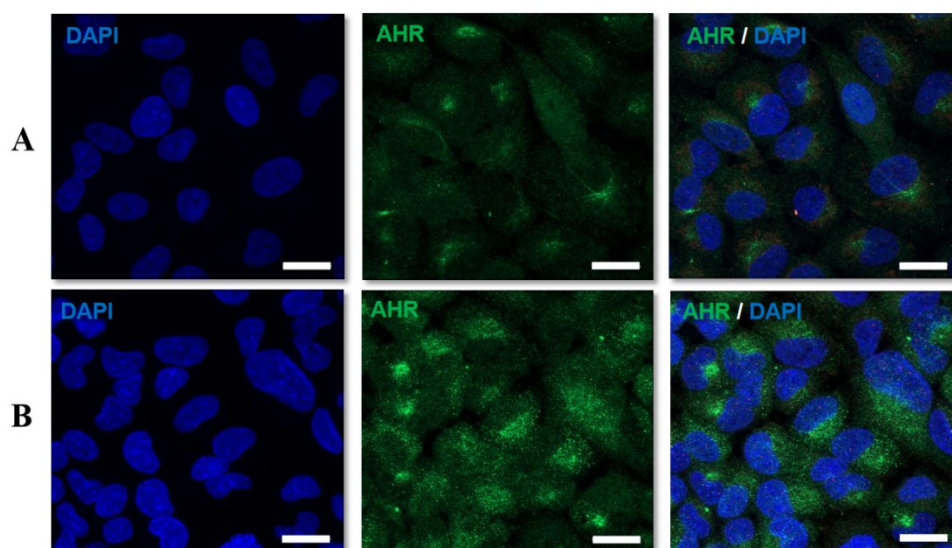


Figura 13. AHR durante la infección por DENV. Células A549 fueron (A) No infectadas (mock) o (B) Infectadas con DENV-2- (MOI=0,5) por 24h. A continuación, las muestras fueron fijadas con PFA 4% por 20-30 min a temperatura ambiente y procesadas para IFI. AHR fue teñido en verde mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome VI (Zeiss). Las micrografías corresponden a proyecciones de intensidad promedio (Average intensity projections, AIPs) generadas a partir de Z-stacks. La barra de escala corresponde a 20µm en todas las imágenes. Aumento 630X.

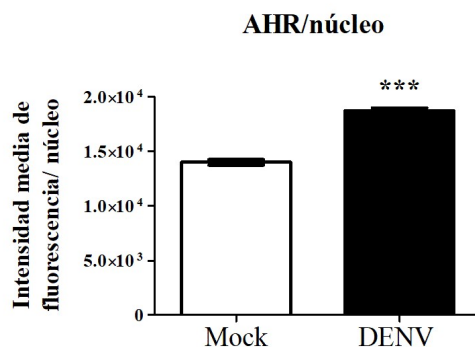


Figura 14. Cuantificación de los niveles de AHR en el núcleo durante la infección por DENV. Células A549 fueron no infectadas (mock) o infectadas con DENV-2(MOI=0,5) por 24h. A continuación, las muestras fueron fijadas con PFA 4% por 20-30 min a temperatura ambiente y procesadas para IFI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome VI (Zeiss). A partir de los Z-stacks se generaron proyecciones de intensidad promedio (AIPs) que fueron empleadas para realizar la cuantificación semiautomática de la intensidad media de fluorescencia (IMF) a nivel nuclear mediante FIJI (Image J). Los resultados corresponden a la medida de IMF de más de 260 células por tratamiento. Se graficó la media de IFM $\pm$ SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo por T-test no apareado de dos colas con un intervalo de confianza del 95%. p valor ***<0.0001. Los métodos de cuantificación empleados se describen en detalle en la sección de *Materiales y Métodos*.

3. *DENV promueve la translocación de AHR al núcleo durante etapas tempranas de la infección*

Con el objetivo de realizar un estudio más profundo del tráfico intracelular de AHR durante la infección por DENV, se procedió a evaluar si la infección por DENV era capaz de desencadenar la translocación núcleo-citoplasma en las primeras etapas de la infección. Para ello, las células A549 fueron inoculadas con medio (mock) o infectadas con DENV-2 (MOI=0,5) durante 0, 10, 15 o 30 min. A continuación, se fijaron las células y se procesaron por inmunofluorescencia indirecta. Se obtuvieron Z-stacks de cada muestra con el microscopio ApoTome VI (Zeiss) (Figura 15).

Los resultados obtenidos indican que al cabo de 30 min de infección, hay un aumento de los niveles de IMF dentro del núcleo en comparación con el control (Figura 16). Estos resultados sugieren que la infección por el DENV es capaz de desencadenar la translocación del AHR del citoplasma al núcleo en las etapas tempranas del ciclo de multiplicación viral: adsorción, internalización y/o desnudamiento.

En conjunto, estos resultados indican que la infección por DENV no sólo activa la vía de señalización de AHR, sino que también aumenta los niveles de expresión de AHR a las 24hpi y además desencadena el desplazamiento citoplasma-núcleo en las primeras etapas de la infección.

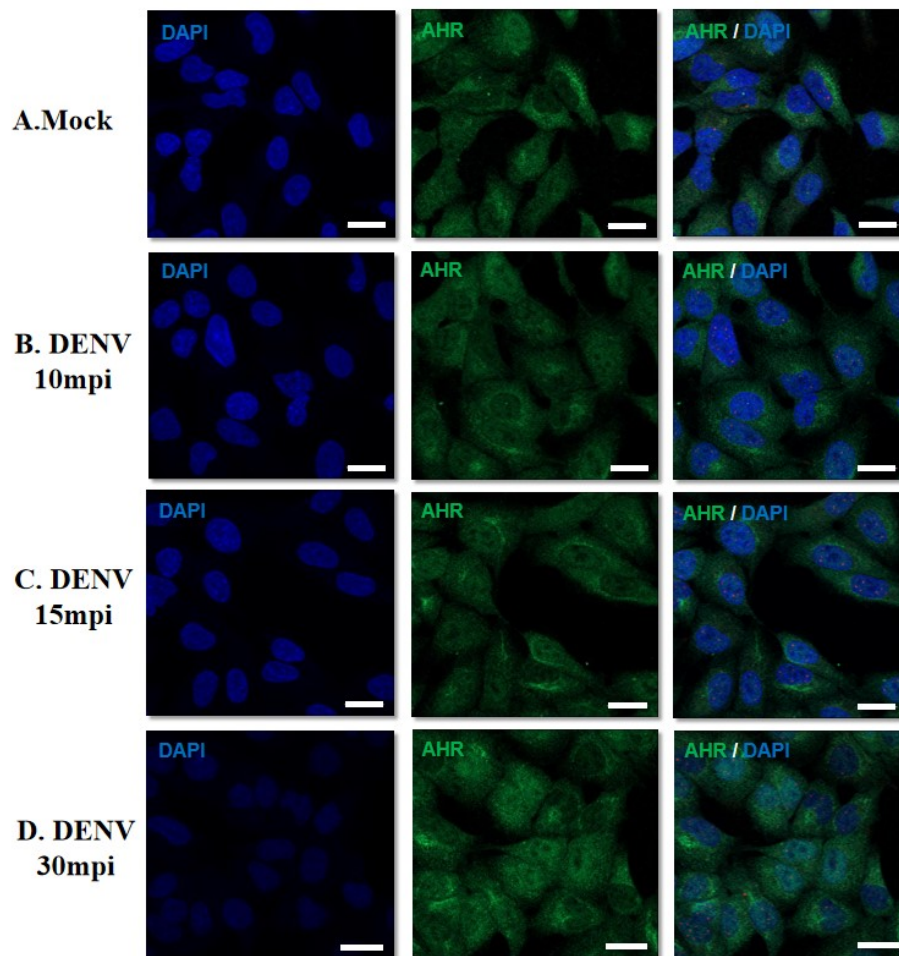


Figura 15. AHR durante etapas tempranas de la infección por DENV. Células A549 fueron (A) No infectadas (mock) o Infectadas con DENV-2(MOI=0,5) por (B) 10 min post infección (mpi), (C) 15mpi o (D) 30mpi. A continuación, las muestras fueron fijadas con PFA 4% por 20-30 min a temperatura ambiente y procesadas para IFI. AHR fue teñido en verde. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome VI (Zeiss). Las micrografías corresponden a proyecciones de intensidad promedio (AIPs) a partir de Z-stacks. La barra de escala corresponde a 20µm en todas las imágenes. Aumento 630X.

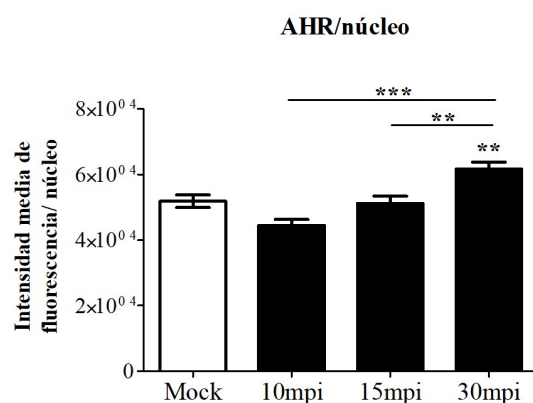


Figura 16. Cuantificación de los niveles de AHR en el núcleo durante etapas tempranas de la infección por DENV.

Células A549 fueron no infectadas (mock) o infectadas con DENV-2(MOI=0,5) por 10,15 ó 30mpi. A continuación, las muestras fueron fijadas con PFA 4% por 20-30 min a temperatura ambiente y procesadas para IFI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome VI (Zeiss). A partir de los Z-stacks se generaron proyecciones de intensidad promedio (AIPs) que fueron empleadas para realizar la cuantificación semiautomática de la intensidad media de

fluorescencia (IMF) a nivel nuclear mediante FIJI (Image J). Los resultados corresponden a la medida de IMF de al menos 50 células por tratamiento. Se graficó la media de IMF ±SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo por one-way-ANOVA seguido por Tukey's post-test. P valor < 0,05 se consideró significativo vs. el mock o el tratamiento correspondiente (indicado por una barra). Los métodos de cuantificación empleados se describen en detalle en la sección de *Materiales y Métodos*.

4. El tratamiento con ARN sintético altera la expresión de AHR

Con el objetivo de dilucidar en mayor profundidad los posibles mecanismos subyacentes involucrados en la activación de AHR durante una infección por DENV, se procedió a realizar ensayos en los que cultivos celulares de Hek293T fueron tratados o transfectados con poly I:C, un análogo de ARN activador de la vía de TLR3, que permite emular en forma simplificada una infección por un virus con genoma de ARN.

En estos ensayos en particular se optó por hacer uso de la línea celular Hek293T debido a que la misma presenta una adecuada activación de la vía de interferón, de la misma manera que A549. Por otro lado, es una línea celular que es susceptible a la infección por DENV y finalmente por ser una línea celular que presenta una tasa de transfección adecuada y que nos permitió evaluar con mejor rendimiento el efecto de la transfección de poly I:C.

En primer lugar se optó por comenzar realizando tratamientos a cultivos celulares de HEK293T con tres concentraciones de poly I:C basándonos en información obtenida de bibliografía (Figura 17A).

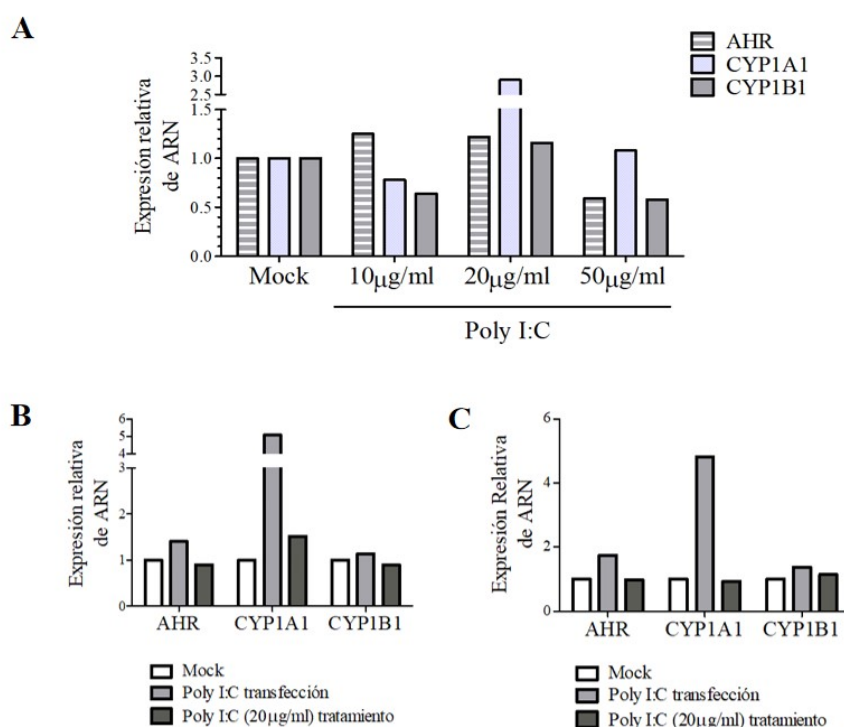


Figura 17. El tratamiento con poly I:C activa la vía de señalización de AHR en forma dosis-dependiente . (A) Cultivos celulares de Hek293T fueron no tratados o tratados con distintas concentraciones de poly I:C (10,20 ó 50 µg/ml) por 24h. A continuación, las las monocapas celulares fueron procesadas para RT-qPCR. Los genes evaluados fueron AHR, sus genes blanco canónicos CYP1A1 y CYP1B1. se graficó la media ±SEM. Cultivos celulares de Hek293T fueron no tratados, tratados con poly I:C (20 µg/ml) o transfectados con poly I:C por 12h(B) ó 24h(C). A continuación, las las monocapas celulares fueron procesadas para RT-qPCR. Los genes evaluados fueron AHR, sus genes blanco canónicos CYP1A1 y CYP1B1 se graficó la media ±SEM

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que la administración de poly I:C en forma de tratamiento es capaz de inducir la expresión del ARNm de AHR y de sus genes blanco CYP1A1 y CYP1B1. En particular, este resultado se observó con el tratamiento con poly I:C (20µg/ml) poniendo de manifiesto que poly I:C es capaz de incrementar los niveles de ARNm de AHR y CYP1A1 de forma dependiente de la dosis (Figura 17A). Por otro lado, el aumento de CYP1A1 (principalmente) tras el tratamiento con poly I:C también revela que el análogo de ARN desencadena la activación de AHR (Figura 17A). Por estos motivos, se decidió que los subsiguientes ensayos que involucraran el tratamiento con poly I:C se llevarían a cabo con la concentración 20µg/ml.

Con motivo de evaluar posibles diferencias entre el tratamiento con poly I:C y la transfección con este análogo de ARN, cultivos celulares de Hek293T fueron tratados o transfectados con poly I:C por 12h ó 24h. Posteriormente, las células fueron cosechadas y procesadas por RT-qPCR con el objetivo de evaluar la potencial activación de la vía de AHR. Los resultados se visualizan en la figura 17B.

Los ensayos de tratamiento y transfección de poly I:C, permitieron confirmar que efectivamente poly I:C es capaz de activar la vía de señalización de AHR, incluso a las 12h (Figura 17B). Si bien, la transfección de poly I:C aumentó en mayor medida la activación de AHR, el tratamiento con el mismo también presentó esta capacidad, y si bien la amplitud de la activación no fue tan marcada, permite evaluar el fenómeno en cultivos celulares que son difícilmente transfectables como lo son las células A549. Con lo cual, la posibilidad de apreciar este fenómeno con un tratamiento con poly I:C, permite ampliar el repertorio de experimentos a realizar en nuestras líneas celulares de interés, ya que además, los procesos de transfección suelen ser nocivos para las células.

Varios trabajos indican que las vías de AHR y de los receptores de tipo Toll (TLR), interactúan entre sí y se contra-regulan [81,128]. De hecho, no sólo se ha reportado que la activación de TLR promueve un aumento de la expresión de AHR [81], lo cual a su vez generaría una mayor sensibilidad frente a los efectos de ligandos de AHR [128], sino que además, AHR actuaría como un supresor de la vía de señalización de TLR [81]. En particular, se ha descrito que AHR es capaz de modular la actividad de TLR3 [128,129]. TLR3 es un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) fundamental de la respuesta inmune innata que reconoce ARN simple cadena (sc) y consecuentemente de disparar una respuesta inflamatoria acorde al estímulo censado.

La evidencia científica mencionada previamente nos permite explicar nuestros hallazgos al realizar el ensayo con distintas concentraciones de poly I:C. Los resultados sugieren que la activación de AHR observada luego de la administración de poly I:C, sería mediada por una activación de TLR3, que consecutivamente, induciría la activación de AHR.

Este resultado, nos pareció muy interesante por permitirnos abordar una nueva rama de la activación de AHR durante la infección por DENV. Hasta el momento, habíamos podido describir que durante la infección por DENV, AHR era activado y dicha activación le permitía una mejor replicación a nivel celular, sin embargo restaba profundizar en los potenciales mecanismos se encontraban asociados a dicha activación.

Estos resultados en conjunto, nos permiten plantear que una de las rutas mediante las cuales AHR es activado durante una infección por DENV puede ser a través de la vía: ARNsc-TLR3-AHR.

Los resultados descritos hasta el momento nos permitieron poner en evidencia que la vía de señalización de AHR se encuentra activada durante la infección por DENV *in vitro*. Con motivo de estudiar el posible rol de AHR durante una infección por DENV, se procedió a llevar a cabo procedimientos experimentales en los que se estudió el impacto de la modulación farmacológica de AHR en la replicación viral.

5. *La modulación farmacológica de AHR impacta en los niveles del genoma viral durante una infección por DENV*

El primer paso para abordar el estudio del rol de la vía de señalización de AHR durante una infección por DENV consistió en la selección de compuestos capaces de modular la actividad de AHR y, subsecuentemente la determinación de las condiciones de trabajo experimentales óptimas. Lo primero que se realizó, fue la determinación de los rangos de concentración de las drogas a emplear a través de un ensayo de citotoxicidad de compuestos mediante el método de determinación de la viabilidad celular con cristal violeta. Una vez determinados dichos rangos, se procedió a evaluar la capacidad de activar o de inhibir a AHR en particular de las concentraciones de las drogas seleccionadas haciendo uso de RT-qPCR. Los protocolos y resultados de procedimientos de optimización de condiciones experimentales se detallan en la sección *Materiales y Métodos*.

Considerando que DENV-2 activa AHR durante la infección y que en nuestro grupo se ha podido determinar que AHR desempeña un rol pro-viral durante una infección por el flavivirus Zika, la probabilidad de que AHR también se encontrara cumpliendo un rol pro-viral durante la infección por DENV era muy alta.

Con el objetivo de estudiar el potencial rol pro-viral de AHR durante la infección por DENV, se llevó a cabo un ensayo antiviral. Para ello, cultivos celulares fueron tratados por un determinado tiempo con distintas concentraciones de un antagonista selectivo de AHR (CH223191) previo a la infección viral. Brevemente, células A549 fueron pre-tratadas con CH223191 (antagonista) por 90 min previo a la incorporación del inóculo viral, y al cabo de 24h se cosecharon las monocapas celulares en TRIzol para realizar RT-qPCR.

En la sección *Materiales y Métodos* se aborda en profundidad el protocolo de los ensayos antivirales y el procesamiento de las muestras para RT-qPCR. Los resultados del ensayo se observan en la Figura 18.

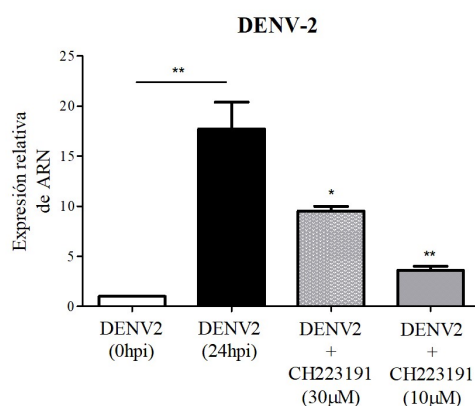


Figura 18. El bloqueo farmacológico de AHR reduce la expresión de ARN viral. Cultivos celulares de A549 fueron tratados con CH223191 (antagonista selectivo de AHR) o con medio. Posteriormente los células fueron infectadas con DENV-2 y luego de la adsorción viral, el medio con tratamientos fue reincorporado a los cultivos. Las células fueron incubadas por 24h a 37°C con un 5% CO₂ y en ausencia de luz, ya que este ligando de AHR presenta foto-sensibilidad. A continuación, se realizó la cosecha de las monocapas de células para procesarse por RT-qPCR. Se determinaron los niveles de ARN con primers para DENV-2-env. Los resultados corresponden a la media del cambio total de ARN para cada gen, de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo por one-way-ANOVA seguido por Tukey's post-test. P valor < 0.05 se consideró significativo vs. control DENV (24hpi) o frente al 0hpi (barra superior).

Los resultados obtenidos indican que el bloqueo de la vía de señalización de AHR con CH223191 en una concentración de 10µM ó 30µM es capaz de reducir significativamente el nivel de ARN viral a 24hpi (Figura 18). Curiosamente, la disminución del ARN viral registrada en tratamientos de 30µM, no fue mayor que la observada a 10µM, lo cual podría deberse a que una mayor inhibición de AHR podrían terminar afectando otros procesos moleculares que eventualmente terminen siendo nocivos para la célula, y consecuentemente, terminen provocando una menor reducción de los niveles de genoma viral.

6. La modulación farmacológica de AHR altera el porcentaje de células infectadas por DENV y los niveles de expresión de proteínas virales

La evaluación de la expresión de proteína viral se llevó a cabo mediante IFI a partir de monocapas de células pre-tratadas con distintas concentraciones de I3S (Figura 19) ó CH223191 (Figura 20) y posteriormente infectadas con DENV-2(MOI=0,5). Al cabo de 24h, las células fueron fijadas y se procedió a realizar la tinción de núcleos con DAPI (azul) y de la proteína E de envoltura de DENV (DENV-E) (rojo).

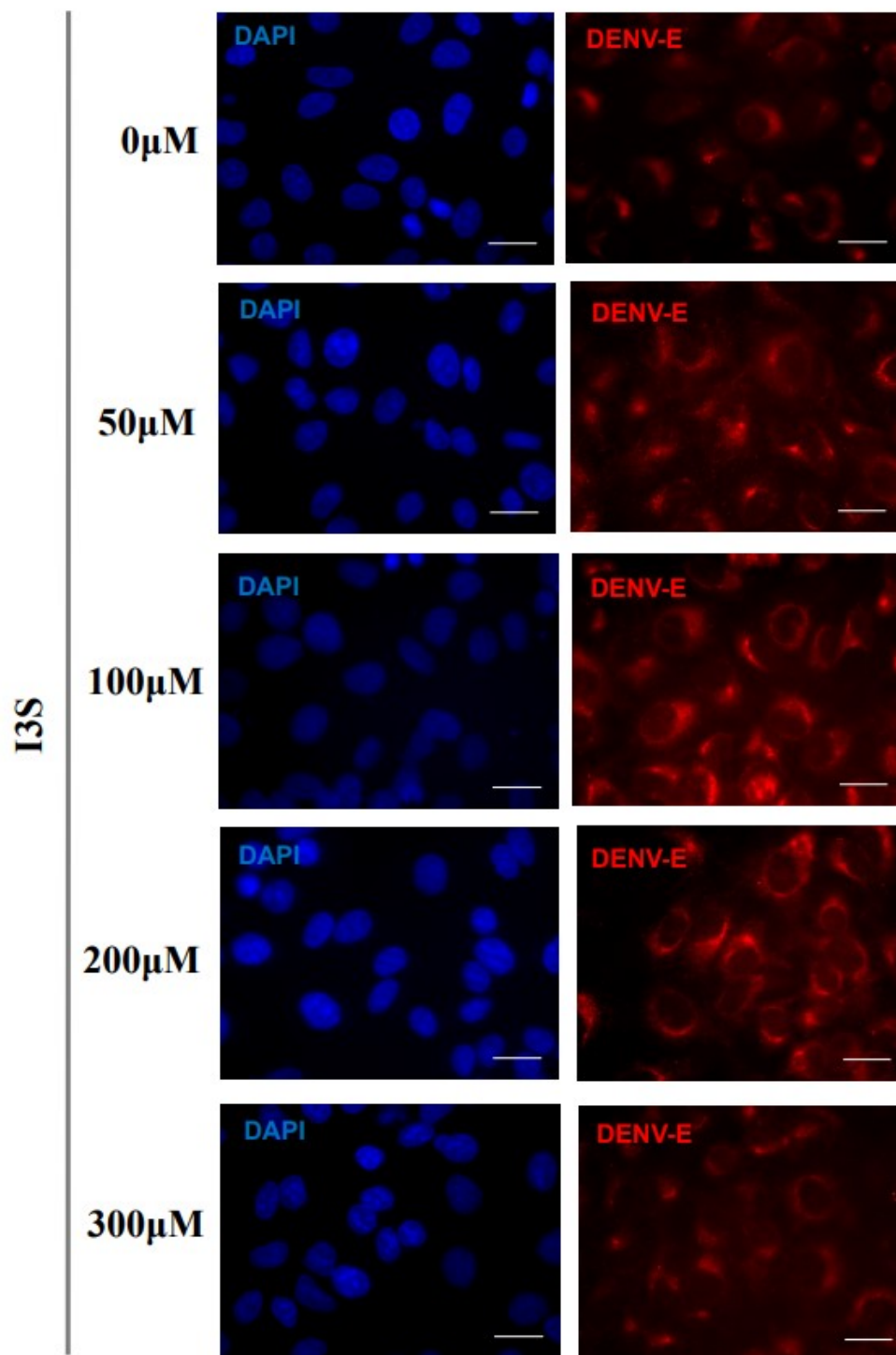


Figura 19. La activación de AHR aumenta la expresión de proteína viral. Células A549 fueron tratadas con distintas diluciones de I3S y posteriormente fueron infectadas con DENV-2 (MOI=0,5) por 24h. A continuación, las muestras fueron fijadas con metanol por 10 min a -20°C. Posteriormente, se procedió a marcar la proteína E de envoltura de DENV (DENV-E) en rojo y los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las muestras teñidas se montaron con DABCO tamponado con glicerina. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio (X). La barra de escala corresponde a 20μm en todas las imágenes. Aumento 600X.

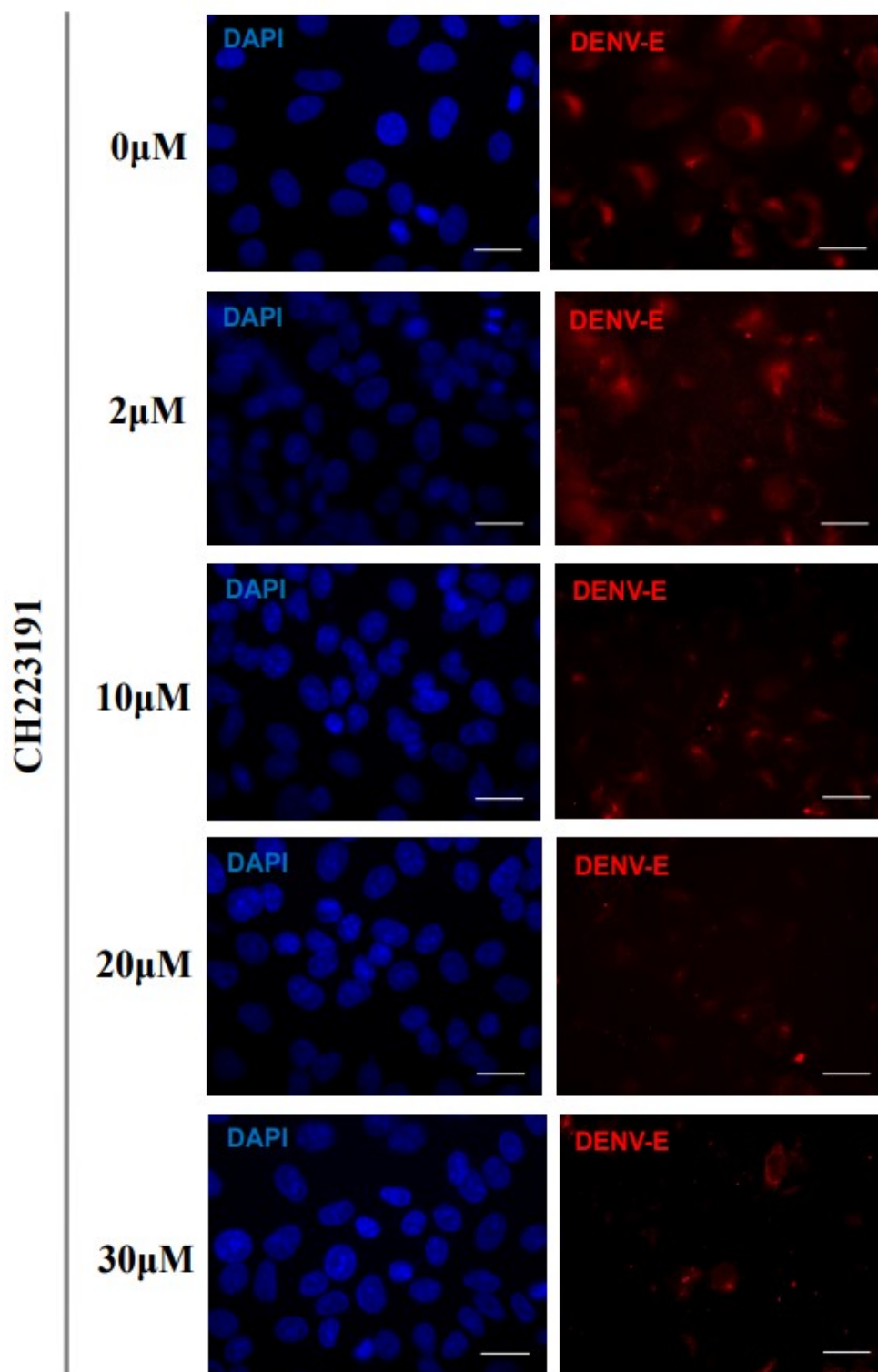


Figura 20. La inhibición de AHR disminuye a expresión de proteína viral durante la infección por DENV-2. Células A549 fueron tratadas con distintas diluciones de CH223191 y luego fueron infectadas con DENV-2 (MOI=0,5) por 24h. A continuación, las muestras fueron fijadas con metanol por 10 min a -20°C. Posteriormente, se procedió a marcar la proteína E de envoltura de DENV (DENV-E) en rojo y los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las muestras teñidas se montaron con DABCO tamponado con glicerina. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio (X). La barra de escala corresponde a 20μm en todas las imágenes. Aumento 600X.

Los resultados obtenidos indican que cuando se activa la vía de señalización de AHR, hay un aumento en la expresión de proteína viral de la envoltura de DENV-2 (Figura 19). Sin embargo, el porcentaje de células infectadas positivas para el antígeno E (DENV-E (+)), no se ve alterado significativamente respecto del control viral (Figura 21A). Por el contrario, cuando se bloquea farmacológicamente la vía de AHR previo a la infección con DENV, se observa una drástica disminución de los niveles de la proteína de envoltura (Figura 20). Aún más importante, esta disminución presenta un comportamiento dosis-dependiente y se observa incluso a la menor concentración empleada (Figura 20). El análisis del porcentaje de células infectadas evidenció, que el tratamiento con CH223191 provocó una reducción significativa del número de células infectadas por DENV respecto del control viral (Figura 21), en forma dosis-dependiente e incluso en la concentración más baja empleada (Figura 21).

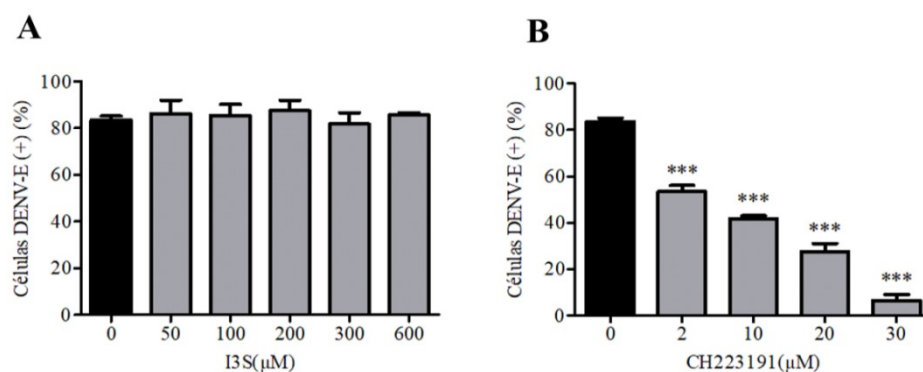


Figura 21. Impacto de la modulación de AHR en el porcentaje de células DENV-E (+). **Cuantificación.** Células A549 fueron pre-tratadas con distintas concentraciones de I3S (A) o CH223191 (B) y posteriormente fueron infectadas con DENV-2(MOI=0,5) por 24h. A continuación, las muestras fueron fijadas con metanol por 10 min a -20°C. Posteriormente se procedió a marcar la proteína E de envoltura de DENV (DENV-E) en rojo y los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las muestras teñidas fueron montadas con DABCO tamponado con glicerina. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio (X). Los resultados corresponden a la cuantificación de células positivas para DENV-E. Se graficó la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo por one-way ANOVA seguido de Tukey's post-test. P valor < 0.05 se consideró significativo vs. el control viral (0μM).

7. La modulación farmacológica de AHR afecta la producción de partículas virales infectivas

Los resultados previamente obtenidos nos permitieron evidenciar por primera vez que por un lado, DENV activa la vía de señalización de AHR durante una infección in vitro, y por otro lado, que la modulación farmacológica de AHR, afecta los niveles de genoma viral, los niveles de expresión de proteína viral y el porcentaje de células infectadas a 24hpi.

El próximo paso de nuestra investigación consistió en evaluar si la modulación farmacológica de AHR impactaba en la producción de partículas virales infectivas. Para ello, se tomaron los sobrenadantes de los cultivos provenientes del ensayo antiviral en los que se

pre-trató los cultivos de A549 con I3S (Figura 22A) ó CH223191 (Figura 22B) y que posteriormente fueron infectados con DENV-2(MOI=0,5). A continuación se realizó la determinación del rendimiento viral mediante titulación por formación de placas de lisis (UFP/ml) bajo metilcelulosa.

Los resultados observados indican que cuando se estimula la vía de señalización de AHR, no se observan diferencias significativas en la producción de partículas virales infectivas, respecto del control viral(Figura 22A). Ahora bien, en el caso del tratamiento con el antagonista de AHR, no sólo se observó una importante disminución en la liberación de partículas virales de hasta un 99,6%, incluso con la concentración más baja ensayada, sino que además la misma presentó un comportamiento dosis-dependiente (Figura 22B). Estos resultados indican que efectivamente, la vía de AHR está involucrada en el ciclo de replicación viral de DENV-2 *in vitro*.

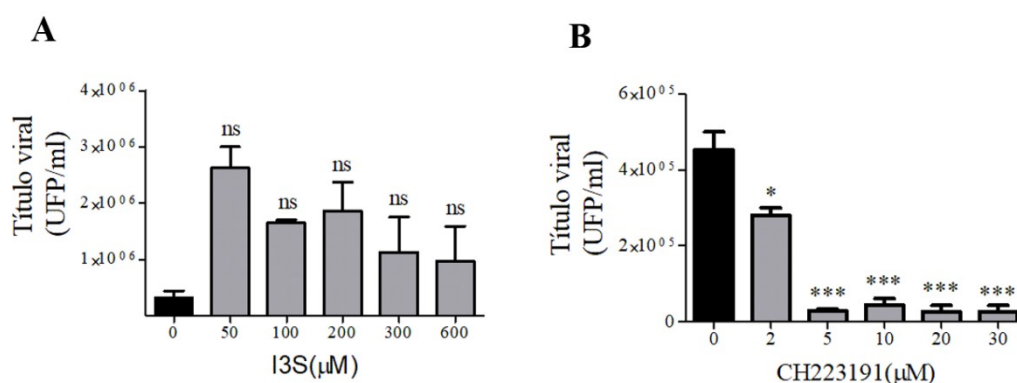


Figura 22. Impacto de la modulación de AHR en el rendimiento viral de DENV-2. Células A549 fueron pre-tratadas con distintas concentraciones de I3S (A) o CH223191 (B) y posteriormente fueron infectadas con DENV-2 (MOI=0,5) por 24h. A continuación, los sobrenadantes de los cultivos fueron cosechados para determinar el título viral mediante el método estándar de cuantificación de unidades formadoras de placa (UFP) bajo metil celulosa (UFP/ml). Se graficó la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo por one-way ANOVA seguido de Tukey's post-test. P valor < 0.05 se consideró significativo vs. el control viral (0μM).

8. *El bloqueo farmacológico de AHR disminuye el rendimiento viral de otros serotipos de DENV en infecciones in vitro*

Debido a que con el bloqueo de AHR se observaron importantes disminuciones del rendimiento viral, se decidió extender el tratamiento con CH223191 para evaluar su posible efecto inhibitorio sobre el resto de los serotipos de DENV. Para ello se procedió a realizar el mismo ensayo antiviral llevado a cabo previamente, pero con DENV-1, DENV-3 y DENV-4, (MOI=0,5). Los resultados correspondientes a la titulación de DENV-1, DENV-3 y DENV-4, en muestras de sobrenadantes cosechados a 24hpi. se encuentran en la figura 21. Se pudo observar que el bloqueo farmacológico de AHR previo a la infección con DENV-1, DENV-3 y DENV-4, también provoca una disminución del rendimiento viral a 24hpi (Figura 23).

Estos resultados en conjunto evidencian no sólo que AHR se encuentra involucrado en el ciclo de replicación de DENV *in vitro*, sino que además el mismo, presentaría un rol-proviral frente a los cuatro serotipos de DENV.

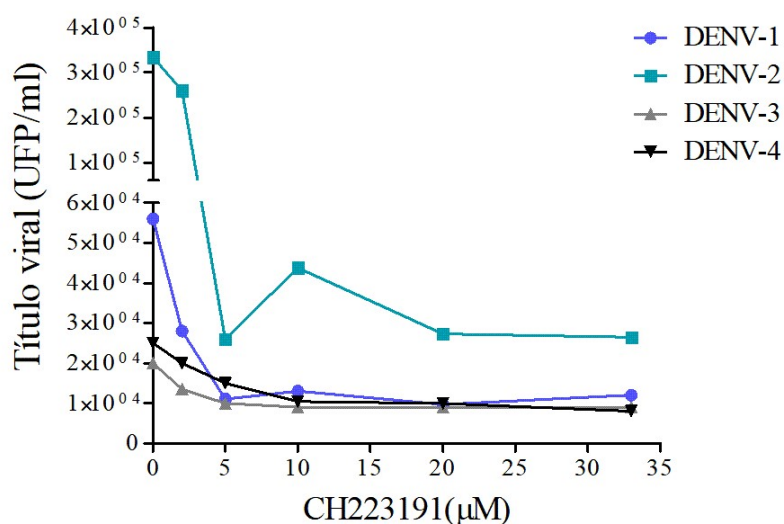


Figura 23. El bloqueo farmacológico de AHR disminuye el rendimiento viral de DENV. Cultivos celulares de A549 fueron tratados con CH223191 (antagonista selectivo de AHR) o con medio. Posteriormente las células fueron infectadas con DENV-1(círculo azul), DENV-2(cuadrado turquesa), DENV-3(triángulo gris) o DENV-4 (triángulo negro). Luego de la adsorción viral, el medio con tratamientos fue reincorporado a los cultivos. Las células fueron incubadas por 24h a 37°C con un 5% CO₂ y en ausencia de luz, ya que este ligando de AHR presentan foto-sensibilidad. A continuación, se realizó la cosecha de los sobrenadantes del cultivo y se realizó la determinación del recuento de partículas virales infectivas por medio del método estándar de cuantificación de unidades formadoras de placa bajo metil celulosa (UFP/ml).

Capítulo I

MODELO PARCIAL

MODELO PARCIAL DEL CAPÍTULO

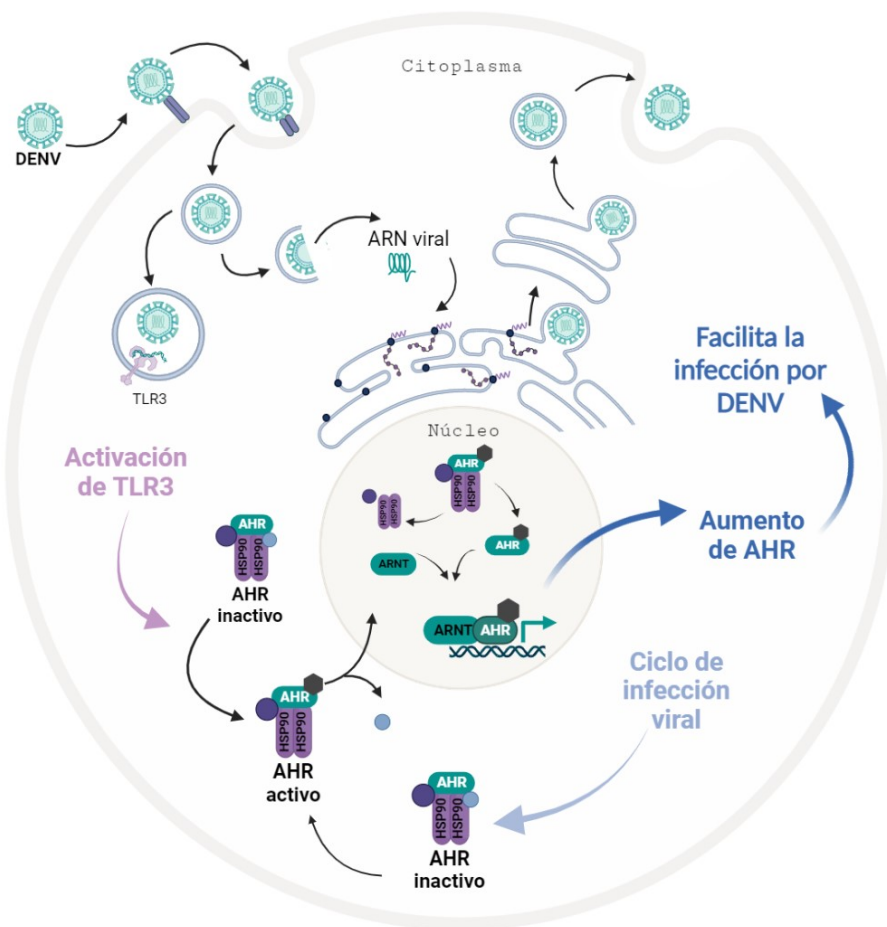


Figura 24. AHR es un factor celular pro-viral importante durante la infección por DENV. La activación de la vía de AHR en el contexto de una infección por DENV podría ocurrir a través de diferentes mecanismos. Por un lado, el ARN viral, sería capaz de promover la activación de AHR vía TLR3. Por otro lado, es posible que otros mecanismos se encuentren involucrados en la activación de AHR por parte de DENV. AHR presentaría un rol pro-viral durante la infección por DENV debido a que su bloqueo farmacológico es capaz de reducir los niveles del ARN viral, los niveles de proteína viral, el porcentaje de células infectadas y la producción de partículas virales infectivas.

Capítulo II

**Explorar la posible interacción de AHR con
el factor de restricción viral PML**

Capítulo II

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

PROTEÍNA DE LA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA (PML)

1. Historia

En el año 1960 fue descrita por primera vez la existencia de cuerpos nucleares en el nucleoplasma de células tumorales de conejos mediante microscopía electrónica [130,131]. Sin embargo, en aquella época, aún no se encontraban disponibles las herramientas y las técnicas necesarias para poder discriminar la identidad del tipo de cuerpo nuclear había sido visualizado en aquel entonces [131].

Cerca de 30 años más tarde, los cuerpos nucleares de PML fueron “re-descubiertos” mediante inmunofluorescencia, haciendo uso de suero de pacientes que cursaban enfermedades autoinmunes [130–132].

Por su parte, la proteína de la leucemia promielocítica (Promyelocytic Leukemia protein; PML) adquiere su nombre a partir de su descubrimiento en pacientes que cursaban una leucemia promielocítica aguda (Acute Promyelocytic Leukemia, APL), en los cuales se había encontrado que PML se encontraba fusionada al receptor de ácido retinoico alpha (RAR α), dando lugar a una proteína de fusión RAR α -PML con propiedades oncogénicas [132,133]. Cabe destacar que la oncogenicidad era producto de la fusión de RAR α con PML, ya que PML presenta una fuerte actividad anti-tumoral [133].

En la actualidad, se encuentra ampliamente extendida la investigación de los denominados cuerpos nucleares de PML (PML nuclear bodies, PML-NBs) en una gran variedad de campos de investigación [131]. Se ha reportado que tanto los PML-NBs como PML, participan en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, denotando su relevancia a nivel celular, incluso durante las infecciones virales. A continuación, se describirán los aspectos más notables de PML, PML-NBs, su dinámica molecular y funciones.

2. Biología molecular y bioquímica de los PML y los PML-NBs

PML es el componente mayoritario de los cuerpos nucleares de PML (PML-NBs) [130,131]. A nivel celular PML presenta varias isoformas producto de distintos eventos de *splicing alternativo*. En particular, las 6 isoformas que conforman los PML-NBs, se diferencian entre sí de acuerdo a su extremo carboxilo terminal que es el que termina siendo modificado luego de los eventos de recombinación que sufren los exones 7,8 y 9. En la Figura 25 se esquematiza la estructura y dominios de PML y de sus distintas isoformas.

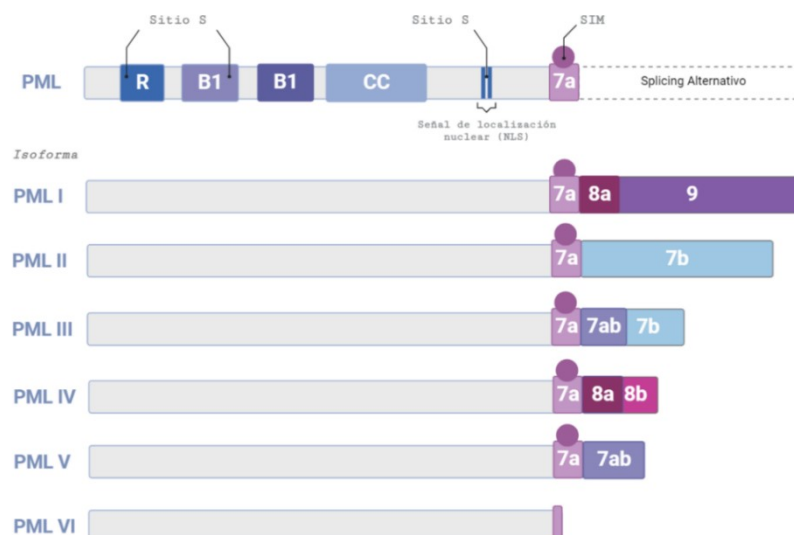


Figura 25. Esquema simplificado de los dominios de PML y sus isoformas. El diagrama superior corresponde a la estructura y dominios de PML. Por debajo, se ubican esquemas simplificados de todas las isoformas PML mostrando qué dominios presentan cada una. Todas las isoformas de PML comparten un extremo amino-terminal común pero difieren en el extremo carboxilo-terminal, debido a que sufren eventos de splicing alternativo los exones 7,8 y 9. Los dominios proteicos de todas las isoformas de PML incluyen: el RING finger (R), las cajas B1 y B2, el motivo coiled-coil(CC), una señal de localización nuclear (NLS) y tres sitios de SUMOilación(S). PML VI no cuenta con el motivo de interacción con SUMO(SUMO interacting motif , SIM) en el exon 7a. Esquema y descripción adaptados de Weidtkamp-Peters et al., 2008.

En lo referido a su actividad, ha sido descrito que las distintas isoformas de PML cumplirían distintas funciones a nivel celular. De hecho, las mismas se presentan en distinta proporción a nivel celular, siendo PMLI y PMLII las isoformas más abundantes. Sin embargo, por las características de la dinámica de formación de los PML-NBs, se considera que todos los PML-NBs de una célula en particular, en un estado en particular, son homogéneos en términos de su composición.

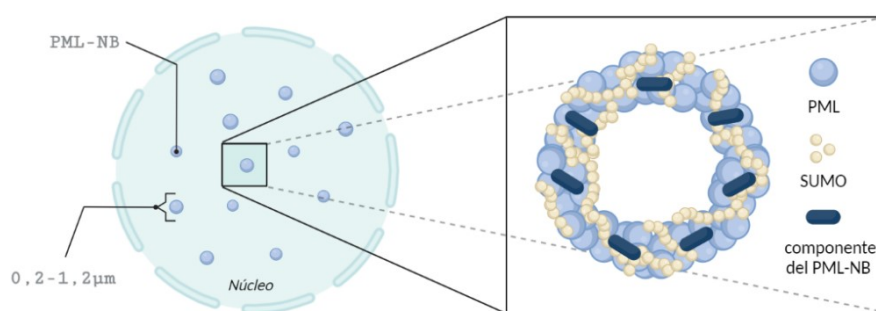
Es interesante destacar que se ha reportado que varios virus afectan en forma isoforma-específica a PML y los PML-NBs [134–136]. Esto, correlaciona con la idea de que los PML-NB desempeñan funciones clave en la respuesta antiviral, particularmente en la respuesta inmune intrínseca [137].

Los PML-NBs son ensamblados macromoleculares proteicos discretos que se caracterizan por ser extremadamente dinámicos y localizarse en el núcleo de células de mamíferos [130]. Si bien el número y la distribución de estas estructuras varía considerablemente de acuerdo al tipo de célula, la fase del ciclo celular en la que se encuentre y la condición celular, en general, cada célula puede presentar entre 5-20 PML-NBs en el núcleo [130]. Los PML-NBs suelen presentar un tamaño que varía entre 0,2-1,2µm en diámetro [130,138](Figura 26).

Los PML-NBs se visualizan como estructuras puntiformes discretas a nivel nuclear mediante microscopía de fluorescencia. Sin embargo, el análisis de la arquitectura de estos dominios mediante microscopía electrónica ha permitido revelar que los PML-NBs, en condiciones normales, exhiben una disposición en forma de anillo y presentan una cubierta externa proteica que puede variar entre los 50-100nm de espesor [130,131,138].

Los PML-NBs clásicamente han sido definidos por la presencia de PML y de Sp100[131]. En la actualidad se considera que una pequeña cantidad de proteínas definen el *core* del PML-NB : PML, DAXX, SP100, SUMO1-3[139]. Asimismo se ha informado que más de 100 otras proteínas se localizan en PML-NB de manera dinámica [139], siendo que ciertos componentes de PML-NB son conocidos por someterse a un intercambio continuo con el nucleoplasma circundante [133].

A. Esquema simplificado de la arquitectura de PML-NB



B. Diagrama simplificado de la dinámica de los PML-NB

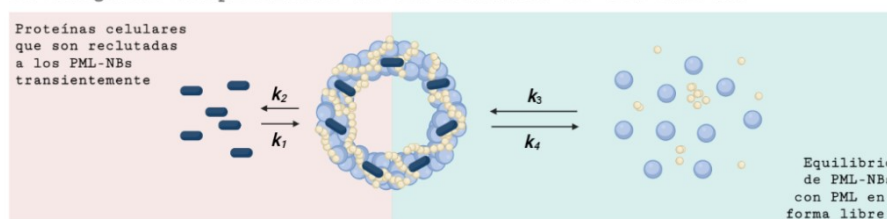


Figura 26. Esquema simplificado de los PML-NBs y su equilibrio de formación. (A) Diagrama simplificado de la estructura de los PML-NBs. En la sección ampliada que muestra el detalle de la estructura, se esquematizaron la distribución en forma de anillo de los componentes principales, como lo es PML (celeste), SUMO (amarillo claro) y componentes que no forman parte del *core* asociados a los PML-NBs (azul oscuro). (B) Diagrama simplificado de la formación de los PML-NBs. Estos ensamblados moleculares se caracterizan por ser extremadamente dinámicos y los mismos se encuentran en equilibrio con una cierta proporción de PML y otros componentes que se encuentran en forma “libre” o “fuera de los PML-NBs”. Por otro lado se describe también la existencia de un equilibrio o tasa de recambio entre componentes que permanecen en forma transitoria en los PML-NBs y la forma libre de los mismos. Las constantes “*k*” refieren a las constantes de asociación o disociación a/de los PML-NBs de cada tipo de componente en forma genérica.

Resulta interesante destacar que si bien se ha descrito que los PML-NBs son dominios asociados a matriz que reclutan una extensa variedad de proteínas que parecen no estar relacionadas entre sí, se sabe que una característica que comparten entre sí las proteínas reclutables es tener la capacidad de ser susceptibles a la SUMOilación [132,140]. Por otro

lado, la composición y la morfología de los PML-NB pueden variar significativamente en respuesta al estrés celular y en particular, frente a una infección por virus [137,141], esto es consistente con el hecho de que PML-NB tiene un papel fundamental en funciones celulares, incluida la respuesta antiviral [142].

La actividad antiviral de los PML-NB se ha demostrado para los virus de ADN, por ejemplo, muchos de los cuales alteran / desorganizan los PML-NB [143,144]. Aunque están menos estudiados, también se ha informado que los virus de ARN, algunos de los cuales constituyen un gran problema de salud pública, utilizan diferentes estrategias para contrarrestar la función antiviral de PML [16,136,145–147], por ejemplo, mediante la interacción de proteínas virales con PML, provocando una subsecuente reorganización de los PML-NBs estructuralmente o incluso promoviendo su re-localización celular [136,145,146,148].

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que PML presenta actividad antiviral frente a DENV-2 [149]. Recientemente, en nuestro grupo también se ha podido identificar que NS5 de DENV promueve el desensamble de PML-NB, y contribuye a la supresión de la respuesta antiviral de la célula hospedadora a través de la interfaz NS5-PML[148].

Considerando que PML limita la replicación viral en múltiples niveles, ya sea secuestrando proteínas virales, inhibiendo la síntesis de ARN mensajero (ARNm) viral e induciendo apoptosis y autofagia en células infectadas, junto con el hecho de que AHR no sólo es capaz de interactuar con un rango diverso de proteínas nucleares, sino que además, parece ser un factor proviral durante las infecciones por flavivirus, podría ser posible que AHR y PML interactúen durante la infección por flavivirus.

Hace unos años, nuestro grupo de investigación, que por varios años se ha focalizado en el estudio del papel de PML durante las infecciones virales, estableció una colaboración con el Dr. Peter Hemmerich, un experto en el campo de PML del Instituto Leibniz sobre el Envejecimiento, Instituto Fritz Lipmann (FLI) en Jena, Alemania. Uno de los antiguos miembros de nuestro grupo, el Dr. Federico Giovannoni, realizó una estadía en el laboratorio del Dr. Hemmerich en Jena, Alemania, y los resultados de dicho trabajo conjunto permitieron identificar que la disrupción de los PML-NB por parte de NS5 contribuye a la supresión de la respuesta antiviral de la célula hospedadora por parte de DENV a través de la interfaz NS5-PML.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que PML presenta un rol anti-viral durante una infección por DENV, mientras que en el primer capítulo de esta tesis hemos podido demostrar por primera vez que AHR desempeña un rol pro-viral durante la infección por DENV.

Teniendo en cuenta que ha sido reportado que PML es capaz de interactuar físicamente con ARNT (proteína con la que heterodimeriza AHR en la vía de señalización canónica de AHR) [150] y que ha sido descrito que tanto ARNT como AHR presentan sitios de SUMOilación [150,151], lo cual constituye un requisito que deben presentar las proteínas capaces de interactuar con PML en los PML-NBs [132,140], entonces el objetivo del trabajo presentado en el presente capítulo fue evaluar la posible interacción entre AHR y PML durante la infección *in vitro* por DENV.

Capítulo II

RESULTADOS

RESULTADOS

Los estudios abordados en este capítulo fueron realizados prácticamente en su totalidad durante una pasantía realizada en Alemania en el centro de referencia en microscopía de fluorescencia y de súper-resolución del Fritz-Lipmann Institute (FLI), Jena, Turingia, Alemania.

Dado que AHR tiene la capacidad de modular al sistema inmune, otro de nuestros objetivos fue evaluar la capacidad de AHR de modular la respuesta inmune frente a DENV. Por lo cual, siendo que PML, al igual que AHR, presenta una gran capacidad de interactuar con diversas proteínas, nos propusimos estudiar la potencial interacción entre estas proteínas que presentan roles antagónicos durante una infección por DENV.

En el Capítulo I pudimos describir en profundidad que durante una infección por DENV aumenta la actividad y la expresión de AHR a 24hpi. Por otro lado, se ha dilucidado que durante una infección por DENV, no sólo hay una disminución de los PML-NBs a las 24hpi, sino que además NS5 de DENV promueve el desensamble de los mismos [148,149]. Por lo cual, nuestro estudio de la potencial interacción de entre AHR y PML, partió de una base de conocer que DENV promueve cambios diferenciales y prácticamente opuestos, sobre ambas proteínas.

1. Estudio de la distribución intracelular de AHR y PML en cultivos no infectados

El primer paso en nuestra investigación de la posible interacción entre AHR y PML comenzó por la determinación del estado de ambas proteínas en condiciones basales en cultivos celulares. Para ello, se empleó la línea celular A549, el modelo preferentemente utilizado para el estudio de la infección en esta tesis doctoral. Para ello, células A549 fueron cultivadas a una confluencia de 75-85%, luego los mismos se fijaron con PFA 4% y posteriormente se procedió a realizar una IFI en la que se marcó específicamente a PML y a AHR con la tinción optimizada en esta tesis doctoral. La misma se describió en el *Capítulo I*.

Los resultados obtenidos indican que células con una mayor cantidad de AHR en el núcleo contienen una menor cantidad de PML en el mismo (Figura 27). Por el contrario, células del mismo cultivo que contienen una menor cantidad de AHR a nivel nuclear presentan un mayor número de PML (Figura 27). Estos resultados sugieren que podría llegar a existir una contra-regulación de AHR y PML a nivel nuclear.

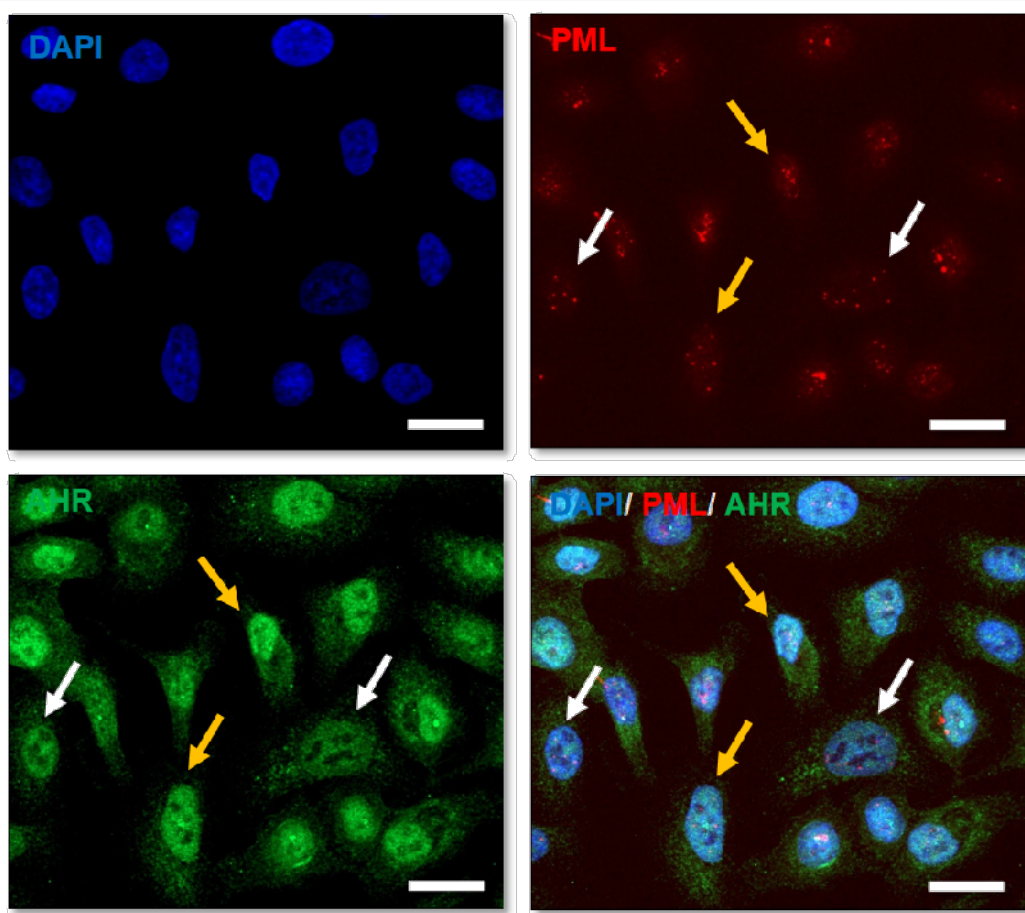


Figura 27. Localización de AHR y PML en A549. Células A549 fueron crecidas a una confluencia de 75-85%. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente y se procedió a realizar la tinción de AHR en verde y de PML en rojo. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome VI (Zeiss). Las micrografías corresponden a proyecciones de intensidad máxima (MIPs) a partir de Z-stacks. Las flechas blancas señalan células que contienen una menor cantidad de AHR en el núcleo y una mayor cantidad de PML. Las flechas amarillas señalan células que contienen una mayor cantidad de AHR en el núcleo y una menor cantidad de PML. Aumento:630X. La barra de escala corresponde a 20µm en todas las imágenes.

2. *El tratamiento con ARN sintético modifica en forma diferencial y dependiente del tiempo la distribución y niveles de AHR y PML*

Para continuar nuestros estudios decidimos estudiar el impacto del ARN viral en los niveles y distribución celular de AHR y PML. Para ello, se utilizó poly I:C es un análogo de ARN sintético que permite emular las infecciones virales por virus con genoma de ARN. Se optó por utilizar la concentración de poly I:C de 20µg/ml ya que la misma es capaz de activar la vía de AHR. Los resultados del ensayo se pueden observar en el *Capítulo I*.

Se realizaron ensayos en los que cultivos celulares fueron tratados a distintos tiempos con poly I:C y posteriormente las muestras fueron procesadas para analizarse por IFI. En particular, decidimos marcar AHR y PML para evaluar el posible impacto del genoma viral en la distribución de estas proteínas. Brevemente, células A549 fueron tratadas con poly I:C durante 0h, 4h, 8h, 12h o 24h y luego fueron fijadas y procesadas para IFI. Se adquirieron

capturas de Z-stacks con microscopía ApoTome VI (Zeiss). Los resultados del ensayo se observan en la Figura 28.

En lo referido a AHR, se observó que el poly I:C no sólo modifica la localización subcelular de AHR en forma tiempo-dependiente, sino que también parece alterar los niveles de expresión de la proteína AHR (Figura 28). La cuantificación de los niveles de intensidad de media de fluorescencia (IMF) a nivel nuclear permitieron corroborar que efectivamente, poly I:C provoca un aumento de la translocación de AHR al núcleo en forma tiempo dependiente (Figura 29A).

Curiosamente, a las 4h y a las 24h de tratamiento, hay una disminución de la IMF de AHR en el núcleo y también en la célula, lo que implica que los niveles de la proteína AHR podrían estar disminuidos. Estas observaciones podrían explicarse por el hecho de que, tras su activación y funcionamiento, el AHR sigue una degradación proteasomal (*Ver Introducción. Vía canónica de AHR*). Estos hallazgos, junto con el hecho de que se observa un aumento en la localización de la AHR en el núcleo en diferentes puntos temporales, sugieren fuertemente que el tratamiento con poly I:C es capaz de desencadenar la activación de la AHR, y posteriormente, el desplazamiento citoplasma-núcleo. Esto, podría implicar que el genoma viral también sería capaz de inducir la activación de AHR durante el ciclo de replicación viral.

En lo referido a PML, se observa que presenta una cinética opuesta. Por un lado, se puede observar que a 4h de tratamiento con poly I:C se observa un aumento de los PML-NBs, que prosigue aumentando hasta las 8h donde se observa un máximo. Por otro lado, a las 12h de tratamiento se puede observar que células que presentan un mayor nivel de AHR a nivel nuclear exhiben un menor nivel de PML-NBs, mientras que células con menores niveles de AHR nuclear cuentan con un mayor nivel de PML-NBs. Finalmente se puede observar que a las 12h de tratamiento el cultivo celular recupera parcialmente el fenotipo inicial (Figura 28).

Para realizar un análisis más detallado del comportamiento de los PML-NBs, se procedió a realizar una cuantificación del número de PML-NBs promedio por célula, y por otro lado, también se llevó a cabo una medición del diámetro de los PML-NBs por célula, para cada condición (Figura 29C).

Poly I:C (20µg/mL)

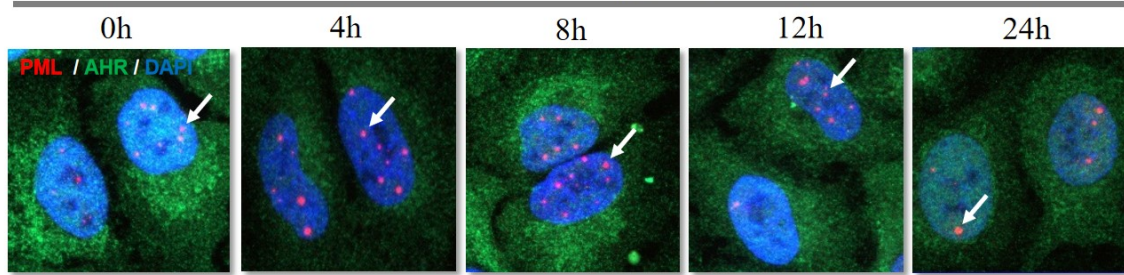


Figura 28. Efecto de poly I:C en AHR y PML a distintos tiempos. Células A549 fueron tratadas con poly I:C (20µg/ml) por 0h, 4h, 8h, 12h ó 24h. Luego las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min y las mismas fueron procesadas para inmunofluorescencia. Se marcaron AHR en verde, PML en rojo y los núcleos en azul con DAPI. Ciertos PML-NBs de interés son señalados en las imágenes con flechas blancas. Imágenes corresponden a regiones de interés (ROI) de fotos capturadas con microscopio un Zeiss ApoTome VI. Aumento: 630X.

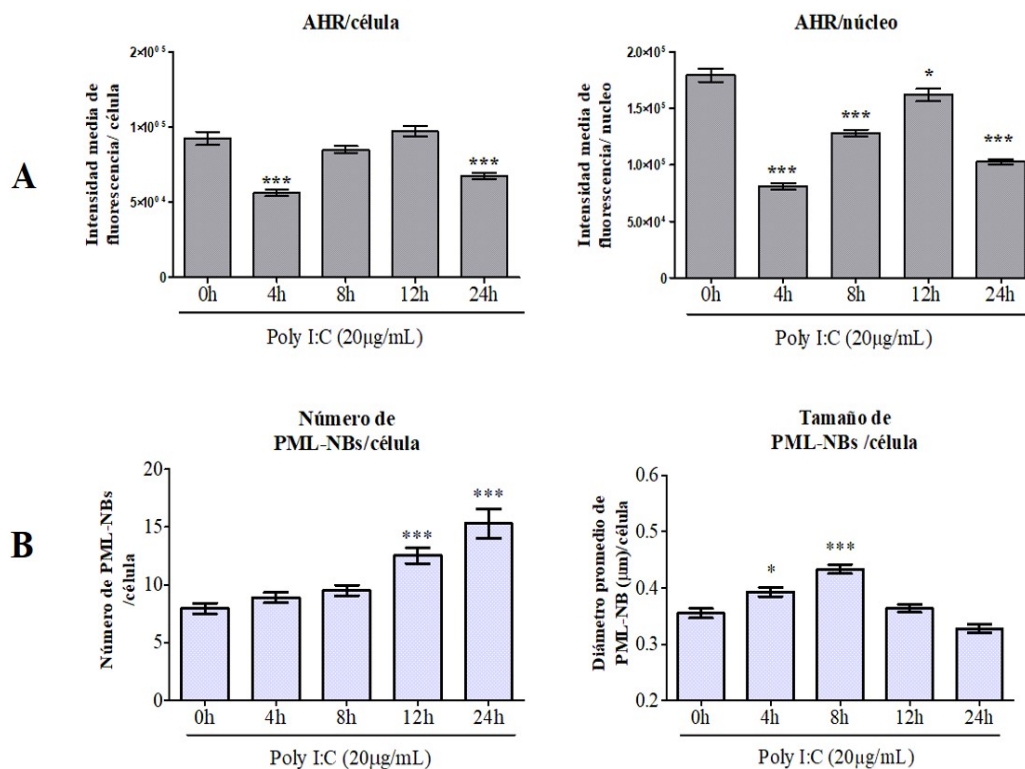


Figura 29. Cuantificación del impacto de poly I:C en AHR y PML. Células A549 fueron tratadas con poly I:C (20µg/ml) por 0h, 4h, 8h, 12h ó 24h, fijadas y procesadas por inmunofluorescencia indirecta. Los Z-stacks adquiridos mediante ApoTome VI (Zeiss) fueron procesados con el programa FIJI (Image J) para la medición de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de AHR y mediante el programa Zen Blue 3.2 Lite (Zeiss) para el análisis de los PML-NBs. (A) Cuantificación de la IMF de AHR en el núcleo (gráfico de la izquierda) o en la célula (gráfico de la derecha). (B) Cuantificación del número de PML-NBs en promedio (gráfico de la izquierda) y diámetro de los PML-NBs (µm) en promedio (gráfico de la derecha). Se graficó la media ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante One-way ANOVA seguido por Tukey's post-hoc test. P valor < 0.05 se consideró significativo vs. control (0h). Los métodos de cuantificación empleados se describen en detalle en la sección de *Materiales y Métodos*.

En principio se puede observar que a las 4h y 8h de tratamiento con poly I:C si bien no se observan cambios en el número promedio de PML-NBs por célula, sí se determinó que hubo un aumento significativo en el tamaño de los mismos (Figura 29C). Si bien, poly I:C gatilla las vías de interferón de tipo I (IFN tipo I), y la expresión de PML aumenta por IFN, dado el poco tiempo de estímulo del tratamiento, es improbable que el aumento en tamaño de PML se debiera a un aumento en la expresión de PML. Por lo tanto, este aumento en tamaño, es probable que sea producto de un desplazamiento en el equilibrio de ensamblado de los PML-NBs, promoviendo que el PML que ya se encuentra en el núcleo en forma “libre” o “no asociada a PML-NBs” comience a formar parte de estos ensamblados moleculares.

Por otro lado, a las 12h de tratamiento con poly I:C se observa un aumento significativo del número de PML-NBs que ocurre en forma concomitante a una disminución significativa del tamaño de los mismos (Figura 29C). Estos resultados sugieren que este aumento de PML-NBs sea producto de un aumento en el desensamble de los PML-NBs de mayor tamaño ya que nuevamente es probable que no sea producto de la vía de señalización de IFN. Para promover un aumento de PML en términos de proteína deberían haber transcurrido cerca de unas 24h. Es importante destacar que a las 12h de tratamiento con poly I:C, también coincide con el mayor nivel registrado de AHR a nivel nuclear luego del tratamiento con poly I:C (Figura 29B). Estos resultados indican que existiría una correlación entre los niveles nucleares de AHR y la estabilidad de los PML-NBs, luego de la administración de poly I:C.

Finalmente a las 24h de tratamiento, se observa un aumento de los PML-NBs en términos de número, que dado que el tamaño de los mismos presenta una disminución significativa el mismo puede corresponder por un lado a un aumento en el desensamble de los PML-NBs y por otro al aumento de la expresión de PML a nivel nuclear (Figura 29C).

En conclusión, los resultados indican lo siguiente:

- (1) La localización de AHR cambia entre el núcleo y el citoplasma tras el tratamiento con poly I:C en forma tiempo-dependiente.
- (2) Luego del tratamiento con poly I:C, los PML-NBs sufren un aumento en tamaño y pero no en número, pero a partir de las 12h puede visualizarse un aumento en número y una disminución en tamaño, lo cual puede indicar modificaciones en el equilibrio de formación de los PML-NBs.
- (3) Los tiempos en los que se detecta una disminución de AHR a nivel nuclear corresponden a los tiempos en los que se observa un aumento en el tamaño de los PML-NBs. Mientras que al aumentar AHR a nivel nuclear, se observa una disminución en el

tamaño de los mismos. Con lo cual parecería que AHR y PML-NBs se excluyen mutuamente a nivel nuclear.

(4) AHR y PML exhiben una distribución celular diferencial luego de administrarse poly I:C y parecen estar contra-regulados a nivel nuclear.

(5) Los efectos de poly I:C sobre AHR y PML son dependientes del tiempo.

3. *AHR y PML en ensayos de co- transfección*

Nuestro próximo paso consistió en evaluar la posible interacción entre AHR y PML en ensayos de transfección. Para ello llevamos a cabo la optimización de la transfección de un plásmido codificante para AHR en fusión con el marco de lectura que codifica para la proteína fluorescente verde (egfp-AHR) gentilmente obsequiado por el Dr. Gordon Hager cuyo laboratorio pertenece al National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, EE.UU. y distintas isoformas de PML en fusión con el marco de lectura que codifica para la proteína fluorescente roja (rfp-PML) fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Peter Hemmerich del FLI, Jena, Alemania (*Ver sección materiales y métodos para más detalles*).

En los experimentos llevados a cabo se pudo trabajar con plásmidos codificantes para las isoformas de PML I, III, IV, V y VI. Es importante destacar que si bien, PML cuenta con isoformas de I-VI, en nuestros estudios, lamentablemente no pudimos incorporar a la isoforma PMLII.

En el laboratorio del Dr. Hemmerich, el plásmido codificante para rfp-PMLII no pudo ser transfectado correctamente en varias oportunidades. Por esta razón, junto con el hecho de que lamentablemente no se pudo obtener nuevo plásmido de rfp-PML II durante el lapso de tiempo en el que realicé mi estadía en Jena, no se pudo incorporar esta isoforma a nuestros estudios.

En primer lugar, realizamos la optimización de la transfección de los plásmidos previamente mencionados en células U2-OS que corresponden al modelo celular por elección para el estudio de PML. Para la transfección se utilizó un protocolo puesto a punto por integrantes del laboratorio del Dr. Hemmerich y el reactivo empleado para el mismo fue FuGene. Los detalles experimentales fueron descritos en la sección *Materiales y Métodos*.

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que el plásmido de egfp-AHR es correctamente transfectado en esta línea celular y que el mismo adopta una distribución principalmente nuclear, con un patrón relativamente homogéneo y con exclusión de nucleolo (Figura 30A). Por otro lado, las distintas isoformas de PML adoptan formas características de estructura puntiforme discreta a nivel nuclear y exhiben diversos tamaños. En particular, cabe destacar que la expresión exógena de PML promueve la formación de estructuras más voluminosas que las que presenta PML en forma endógena (Figura 30B).

Figura 30. Distribución celular de AHR y PML en ensayos de transfección. Células U2-OS fueron transfectadas con rfp-PML (I,III,IV,V,VI) o egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome VI (Zeiss). Las micrografías corresponden a la sección media de Z-stacks. (A) El panel de imágenes corresponde a una célula transfectada con egfp-AHR. (B) El panel de micrografías corresponde a células transfectadas con las distintas isoformas de PML marcada con proteína fluorescente roja (rfp-PML). La barra de escala corresponde a 10µm en todas las imágenes.

4. *AHR y PMLI co-localizan en ensayos de co-transfección*

Con motivo de estudiar la potencial interacción entre AHR y PMLI, llevamos a cabo ensayos de co-transfección en los que células U2-OS con egfp-AHR y rfp-PMLI. Los resultados se visualizan en la Figura 31.

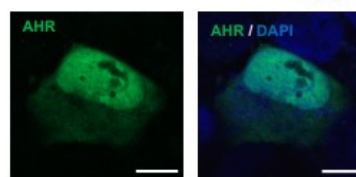
En primer lugar, la distribución de AHR presenta diferencias respecto del observado en células únicamente transfectadas con AHR (Figura 30A). Cuando AHR se expresa en forma exógena en simultáneo con PMLI, se observa que la señal correspondiente a AHR se acumula o agrupa en regiones definidas a nivel nuclear (Figura 31A).

Dichas regiones coinciden con los sitios en que se localiza PML I (Figura 31A). La superposición de canales verde y rojo, resulta en la aparición de color amarillo si ambas señales se encuentran en el mismo lugar. En la figura 31A se visualiza que los sitios de acúmulo de AHR y de PMLI coinciden en la imagen en que se superponen ambos canales.

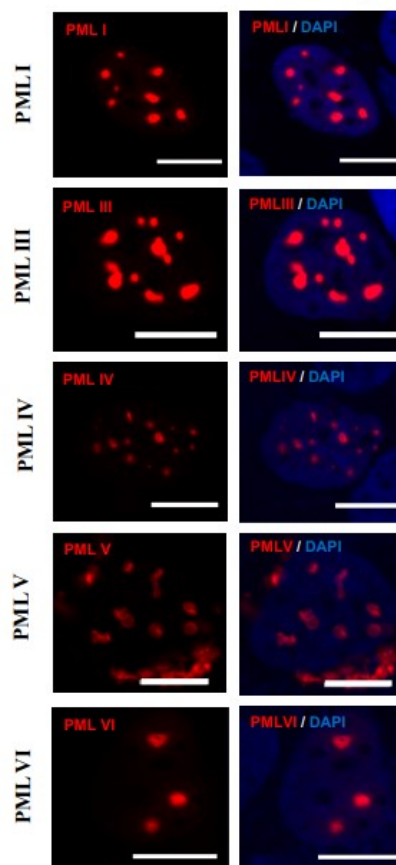
Estos resultados sugieren fuertemente que AHR y PMLI co-localizan a nivel nuclear (Figura 31A). Resulta interesante destacar que la co-localización de AHR y PMLI se pudo observar en células con bajos niveles de expresión de ambas proteínas (Figura 31B) tanto como en células con altos niveles de expresión de ambas (Figura 31C).

Proyecciones en tres dimensiones (3D) generadas a partir de Z-stacks obtenidos por microscopía de fluorescencia con el sistema ApoTome (Zeiss) nos permitieron visualizar que efectivamente, las señales correspondientes a AHR (verde) y a PMLI (rojo) parecieran coincidir a nivel tridimensional (Figura 31D).

A. Células transfectadas con egfp-AHR



B. Células transfectadas con rfp-PML



Con motivo de estudiar en mayor profundidad la posible co-localización entre AHR y PMLI, se procedió a realizar microscopía de super resolución (STED) a partir de muestras provenientes de células co-transfectadas con egfp-AHR y rfp-PMLI. En la Figura 32 se puede visualizar que las intensidades de fluorescencia de la señal roja y la señal verde, en distintas capas del Z-stack, presentan distinta intensidad en las regiones correspondientes a los sitios de mayor intensidad de la señal. Al enfocarnos en ciertas regiones que se ven más intensidad de fluorescencia en uno u otro canal y observar que efectivamente no son más intensas en el otro canal, podemos descartar que la superposición de señales corresponda a que un canal se filtró sobre el otro (Figura 32).

En conjunto, todos estos resultados sugieren fuertemente que AHR co-localiza con PMLI en ensayos de co-transfección. Estos resultados constituyen la primera evidencia de una posible interacción entre ambas proteínas (Figuras 31-32). Resulta importante destacar que esta co-localización ocurre incluso a bajos niveles de expresión de ambas proteínas (Figura 31B).

Una vez que pudimos comprobar que AHR es capaz de co-localizar con PML en ensayos de co-transfección, nuestro siguiente paso fue evaluar si esta co-localización con PML era dependiente de la isoforma de PML. Para ello, se realizó el mismo abordaje experimental y de análisis de imágenes descrito en esta sección. Se llevaron a cabo co-transfecciones del plásmido codificante para AHR (egfpAHR) con distintas isoformas de PML(rfpPMLI, rfpPMLIII,rfpPMLIV,rfpPMLV,rfpPMLVI).Los resultados se muestran en las Figuras 31-40.

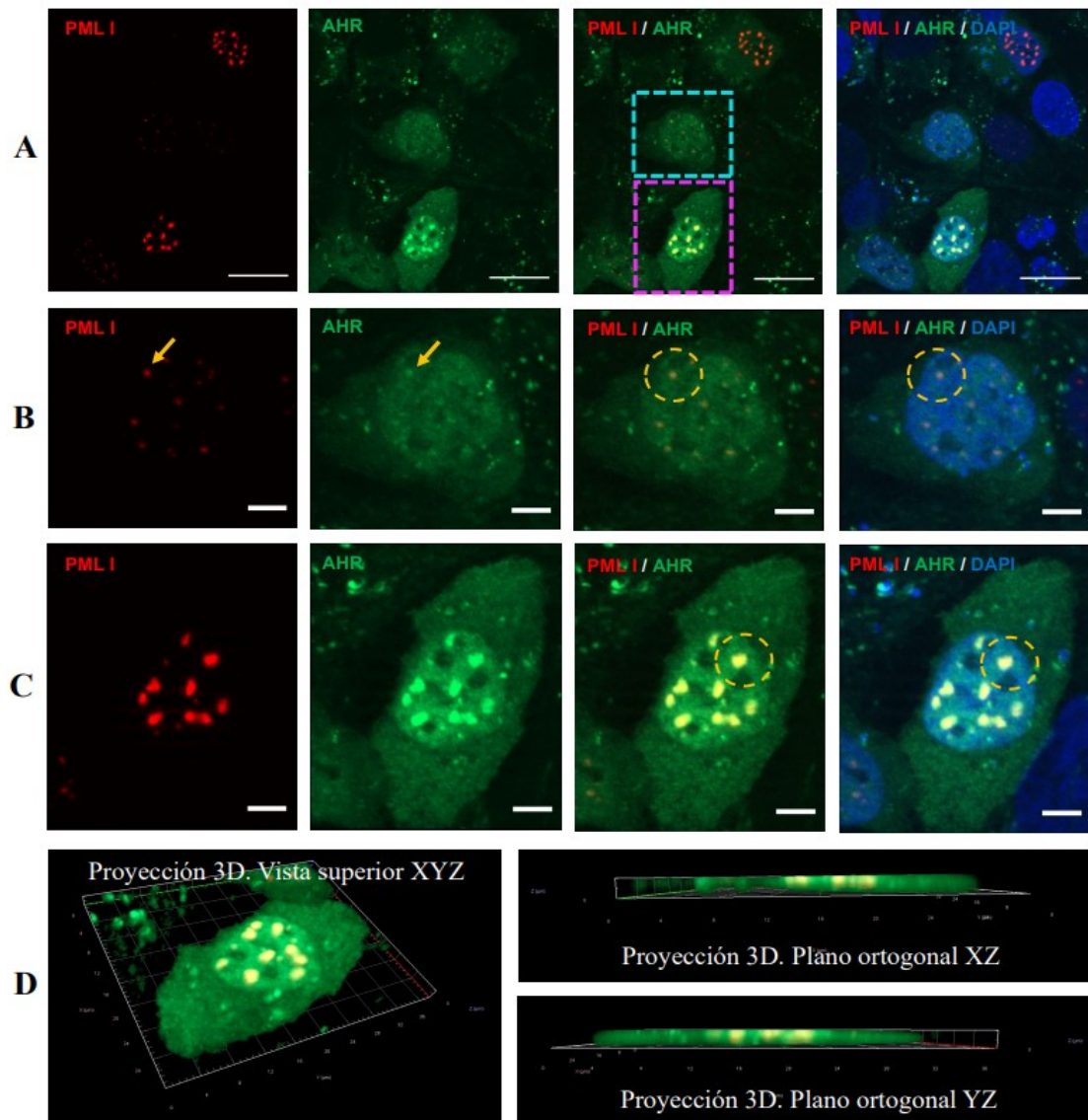


Figura 31. Localización de AHR en ensayos de co-transfección con PML I. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML I y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome VI (Zeiss). (A) Las micrografías corresponden a proyecciones de intensidad máxima (MIPs) a partir de Z-stacks. Las regiones delimitadas por los rectángulos punteados en cian y magenta indican las secciones amplificadas para el análisis de la co-localización. (B) Célula que corresponde a la región delimitada por el cuadrado punteado en cian. La misma presenta bajos niveles de expresión de AHR y PML I. (C) Célula que corresponde a la región delimitada por el rectángulo punteado en magenta. La misma presenta altos niveles de expresión de AHR y PML I. (D) Proyección 3D generada a partir del Z-Stack de (C). Las imágenes corresponden a una vista superior XYZ y a los planos ortogonales YZ y XZ. Los círculos punteados amarillos señalan sitios de co-localización entre PML VI y AHR (amarillo). Las flechas amarillas señalan un sitio de acúmulo de AHR y PML I para una mejor localización. La barra de escala corresponde a 20µm en las micrografías de (A) y a 5µm en el resto de las imágenes. Aumento 630X.

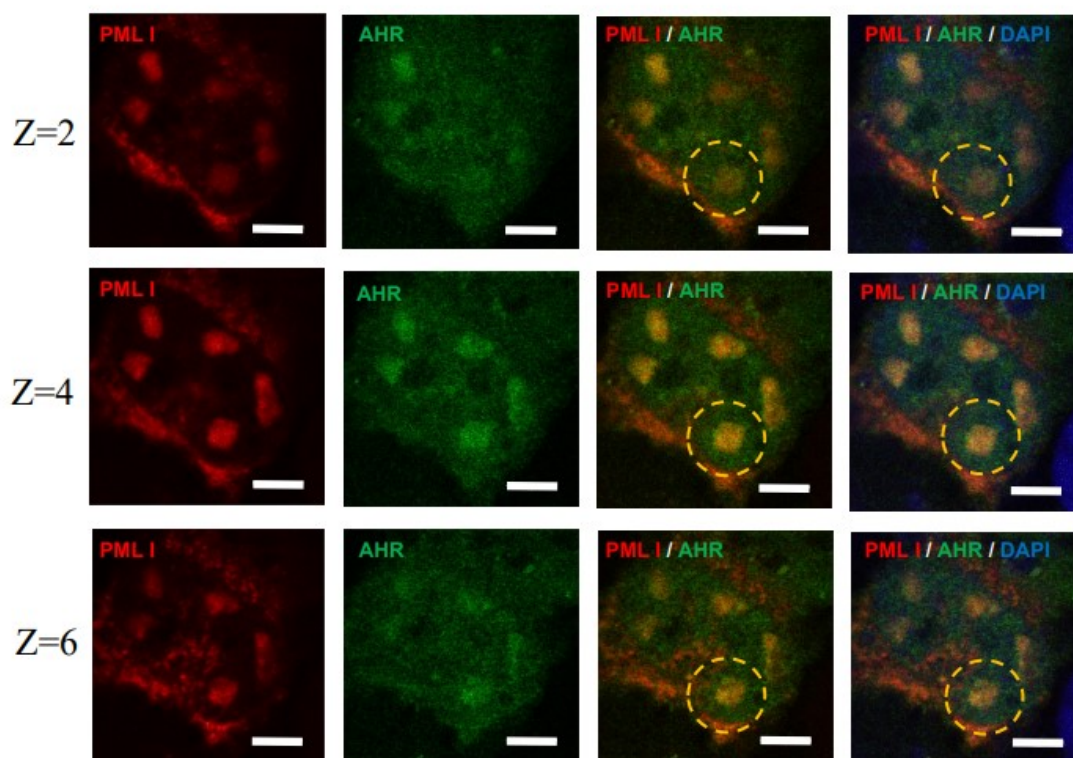


Figura 32. Análisis de co-localización de AHR con PML I en ensayos de co-transfección. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PMLI y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía STED de super resolución con microscopio Leica TCS SP8 STED-3X. Las micrografías corresponden a determinadas secciones de Z-stacks. El panel de imágenes corresponde a una célula con niveles altos de expresión de AHR y PMLI donde se incluyeron la capa media (Z=4) y dos capas por encima (Z=6) y dos por debajo (Z=2). Los círculos punteados amarillos señalan sitios de co-localización entre PMLI y AHR (amarillo). La barra de escala corresponde a 5µm en todas las imágenes.

5. *AHR y PMLIII co-localizan en ensayos de co- transfección*

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que AHR y PMLIII co-localizan a nivel nuclear (Figura 33A-B). La microscopía de super resolución (STED) permitió corroborar que los sitios de co-localización no se deberían a que un canal se filtró sobre el otro (Figura 34). Asimismo, se pudo detectar una co-localización de AHR y PMLIII incluso en células con diferentes niveles de expresión de AHR (Figura 34).

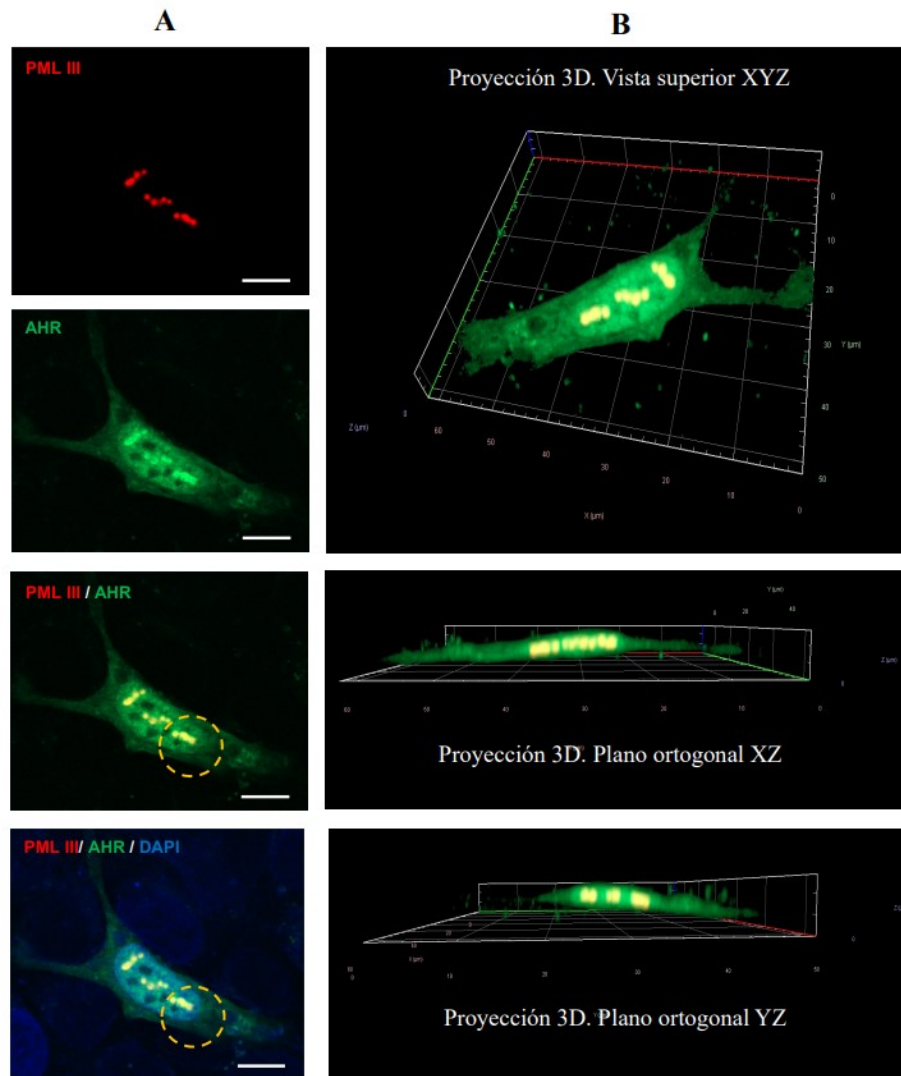
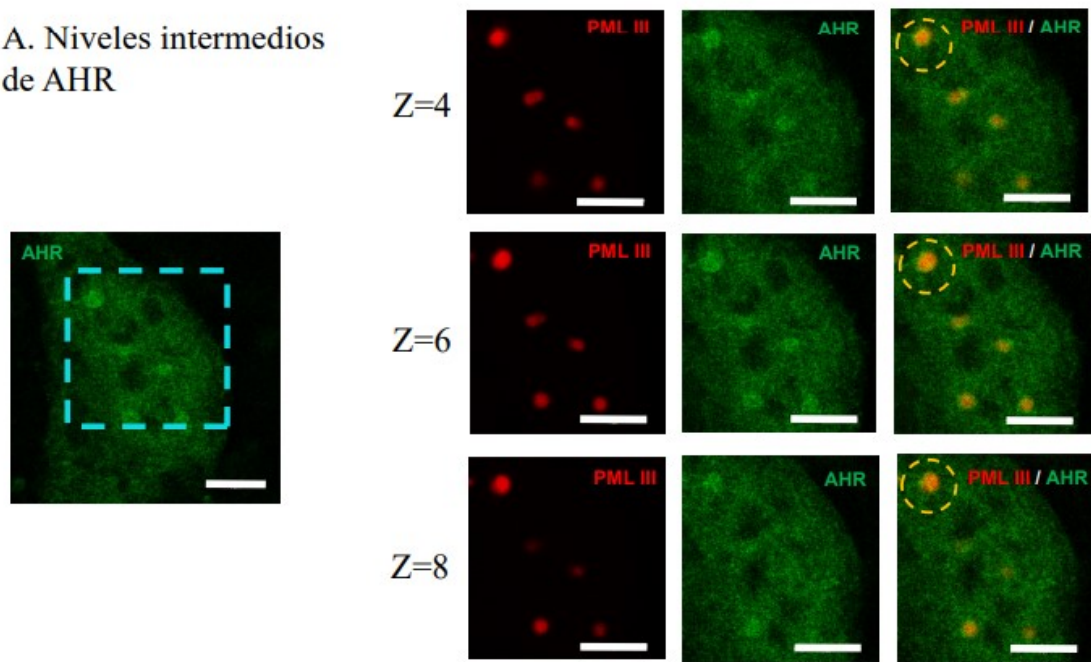


Figura 33. Localización de AHR en ensayos de co-transfección con PML III. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML III y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome V (Zeiss). (A) Las micrografías corresponden a la sección media de Z-stacks. (B) Proyección 3D generada a partir del Z-Stack. Las imágenes corresponden a una vista superior XYZ y a los planos ortogonales YZ y XY. Los círculos punteados amarillos señalan sitios de co-localización entre PML III y AHR (amarillo). La barra de escala corresponde a 10 µm en todas las imágenes. Aumento 630X.

A. Niveles intermedios de AHR



B. Niveles altos de AHR

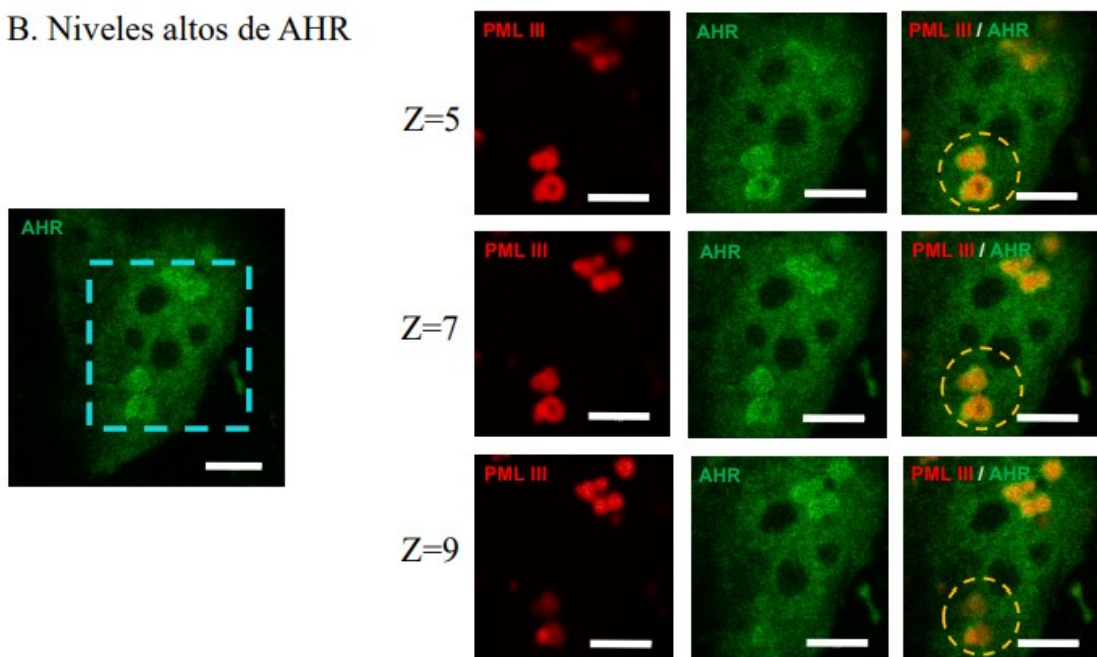


Figura 34. Análisis de co-localización de AHR con PMLIII en ensayos de co-transfección. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PMLIII y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía STED de super resolución con microscopio Leica TCS SP8 STED-3X. Las micrografías corresponden a determinadas secciones de Z-stacks. El primer panel de imágenes (A) corresponde a una célula con niveles intermedios de expresión de AHR, donde se incluyeron la capa media (Z=6) y dos capas por encima (Z=8) y dos por debajo (Z=4). El panel de micrografías de (B) corresponde a los resultados obtenidos con una célula con niveles altos de expresión de AHR, en el que se incluyeron la capa media (Z=7) y dos capas por encima (Z=9) y dos por debajo (Z=5). Las regiones delimitadas por los cuadrados punteados en cian indican las secciones con zoom para el análisis de la co-localización. Los círculos punteados señalan sitios de co-localización entre PML III y AHR (amarillo). La barra de escala corresponde a 5µm en todas las imágenes.

6. *AHR* y *PMLIV* co-localizan en ensayos de co- transfección

Los resultados sugieren fuertemente que AHR y PMLIV co-localizan a nivel nuclear(Figura 35 A-B). Nuevamente, se pudo determinar por microscopía de super resolución (STED) que la superposición de señales corresponda a que un canal se filtró sobre el otro(Figura 36), sumando evidencia de que la co-localización de las señales correspondería a una co-localización de las proteínas. AHR y PMLIV incluso en células con diferentes niveles de expresión de AHR (Figura 36).

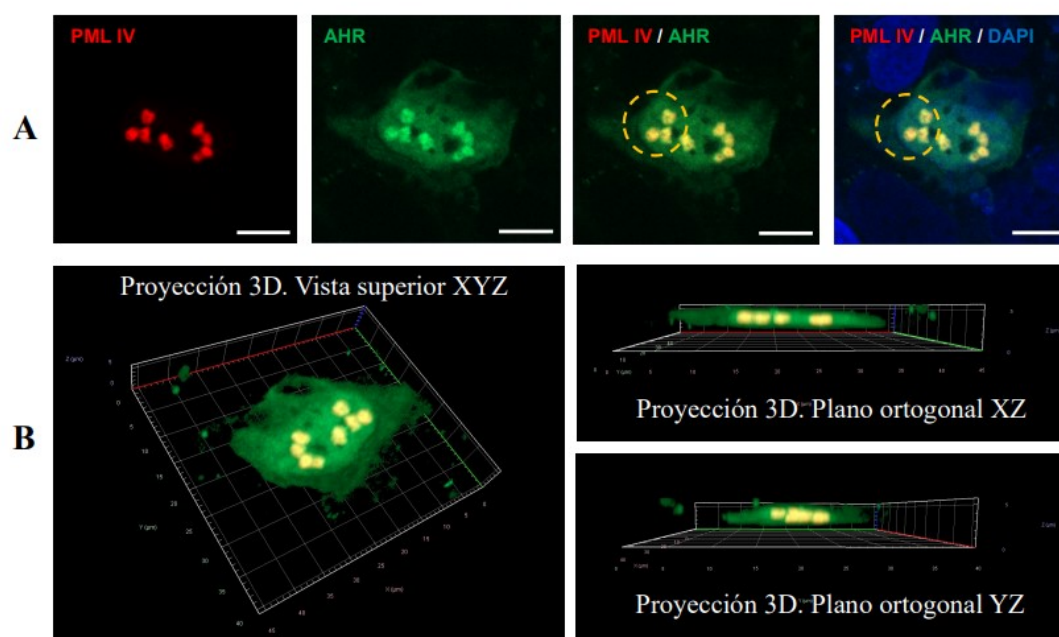


Figura 35. Localización de AHR en ensayos de co-transfección con PML IV. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML IV y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R)con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome V (Zeiss). (A) Las micrografías corresponden a la sección media de Z-stacks. (B) Proyección 3D generada a partir del Z-Stack. Las imágenes corresponden a una vista superior XYZ y a los planos ortogonales YZ y XY. Los círculos punteados amarillos señalan sitios de co-localización entre PML IV y AHR (amarillo). La barra de escala corresponde a 10 μm en todas las imágenes. Amplificación 630X.

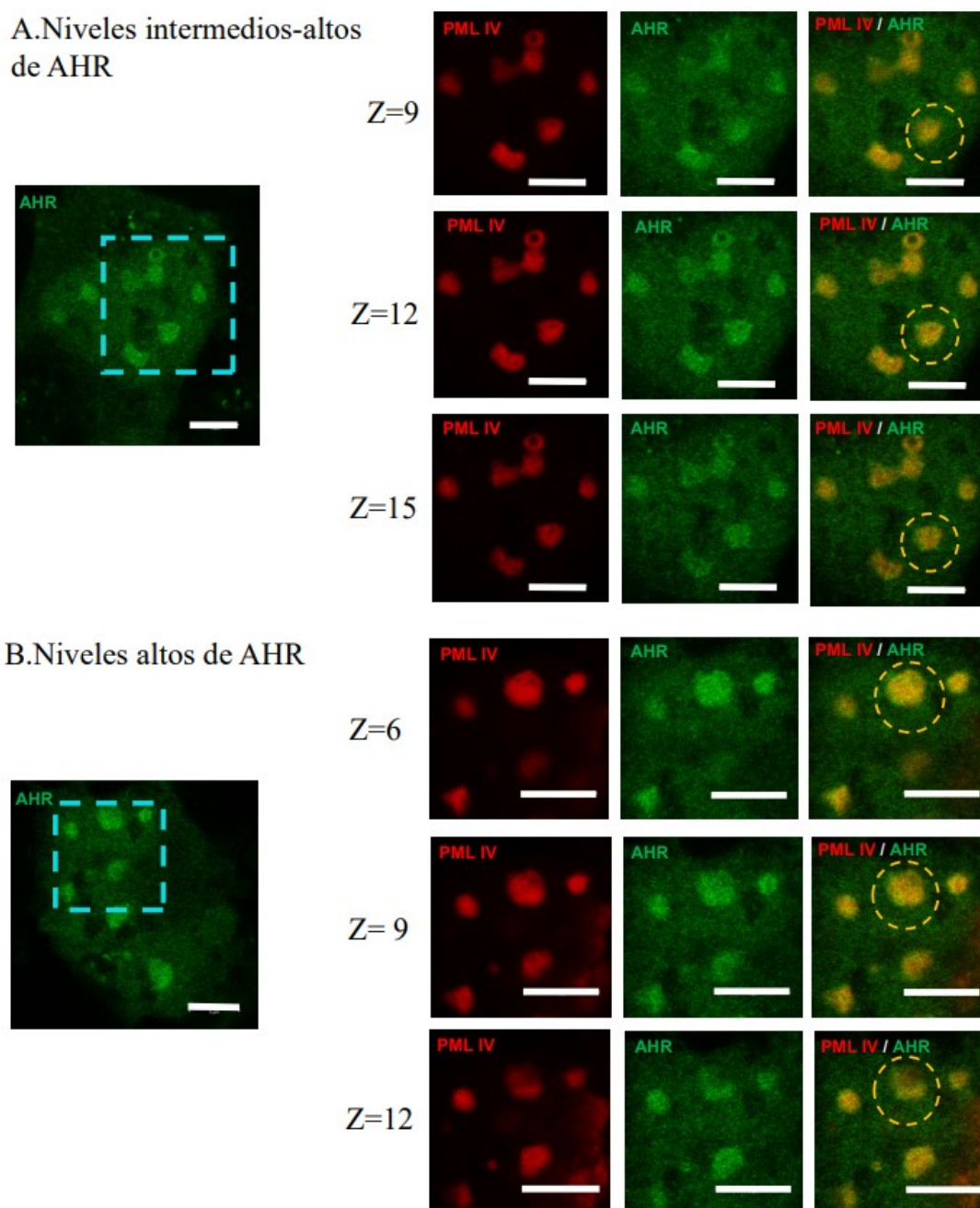


Figura 36. Análisis de co-localización de AHR con PMLIV en ensayos de co-transfección. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PMLIV y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía STED de super resolución con microscopio Leica TCS SP8 STED-3X. Las micrografías corresponden a determinadas secciones de Z-stacks. El primer panel de imágenes (A) corresponde a una célula con niveles intermedios de expresión de AHR, donde se incluyeron la capa media (Z=12) y tres capas por encima (Z=15) y tres por debajo (Z=9). El panel de micrografías de (B) corresponde a los resultados obtenidos con una célula con niveles altos de expresión de AHR, en el que se incluyeron la capa media (Z=9) y tres capas por encima (Z=12) y tres por debajo (Z=6). Las regiones delimitadas por los cuadrados punteados en cian indican las secciones con zoom para el análisis de la co-localización. Los círculos punteados señalan sitios de co-localización entre PML IV y AHR (amarillo). La barra de escala corresponde a 5µm en todas las imágenes.

7. *AHR y PMLV no co-localizan en ensayos de co-transfección*

En primer lugar, resulta interesante destacar que la distribución de AHR prácticamente no presenta diferencias significativas respecto de la observada en células únicamente transfectadas con AHR (Figura 30A). Cuando AHR se expresa en forma exógena en simultáneo con PMLV, se observa que la señal correspondiente a AHR, en una célula con bajos niveles de expresión de AHR parece presentar un leve aumento de la intensidad de fluorescencia en ciertas regiones nucleares compatibles con la localización de PMLV (Figura 37A).

Por el contrario, células con un mayor nivel de expresión de AHR y de PMLV, parecieran exhibir un comportamiento completamente opuesto (Figura 37B). En particular en esta célula se observa no sólo que AHR y PMLV parecerían no localizar en el mismo sitio, sino que además parecería haber una exclusión de AHR en sitios en donde se alojan los PML-NBs (Figura 37B). En la Figura 37C, se puede observar una ampliación de una región de interés de dicha célula, en la que se puede visualizar que en los sitios en los que ubican los PML-NBs presentan una exclusión de la tinción correspondiente a AHR (Figura 37C).

Proyecciones en tres dimensiones (3D) generadas a partir de la célula con mayores niveles de expresión de las proteínas, sugieren que las señales correspondientes a AHR (verde) y a PML V (rojo) no parecieran coincidir a nivel tridimensional (Figura 37D). La superposición de señales verde y roja, no adopta una tonalidad amarilla como la descrita previamente, que indicaría una fuerte concentración de fluorescencia verde y roja en el mismo lugar. Por el contrario, en las imágenes correspondientes a la superposición de canales rojo y verde se puede observar que los sitios en los que se encuentra PML se observan de una tonalidad anaranjada-rojiza que podría corresponder a una disminución de la tonalidad roja por la presencia de fluorescencia verde pero por fuera del PML-NBs, no por estar co-localizando las proteínas (Figura 37 B-D).

La microscopía de super resolución (STED) permitió revelar que efectivamente, la distribución de AHR no se ve modificada por la expresión exógena de PMLV en células con distintos niveles de expresión de AHR (Figura 38A-B). El análisis de la intensidad de fluorescencia de AHR y PMLV parece indicar que, AHR y PMLV no co-localizan en ensayos de co-transfección, al menos, no en la forma en la que sí pareciera ocurrir con PML I, III y IV.

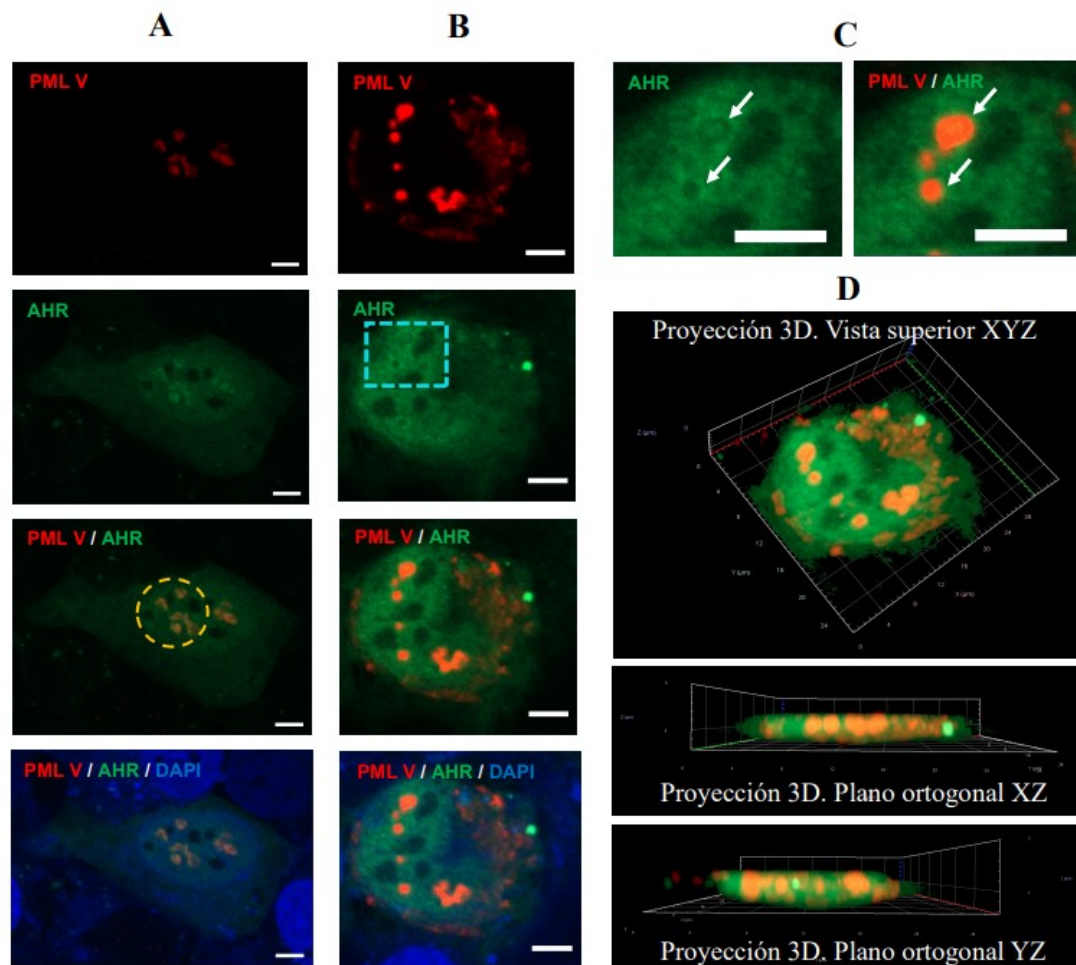
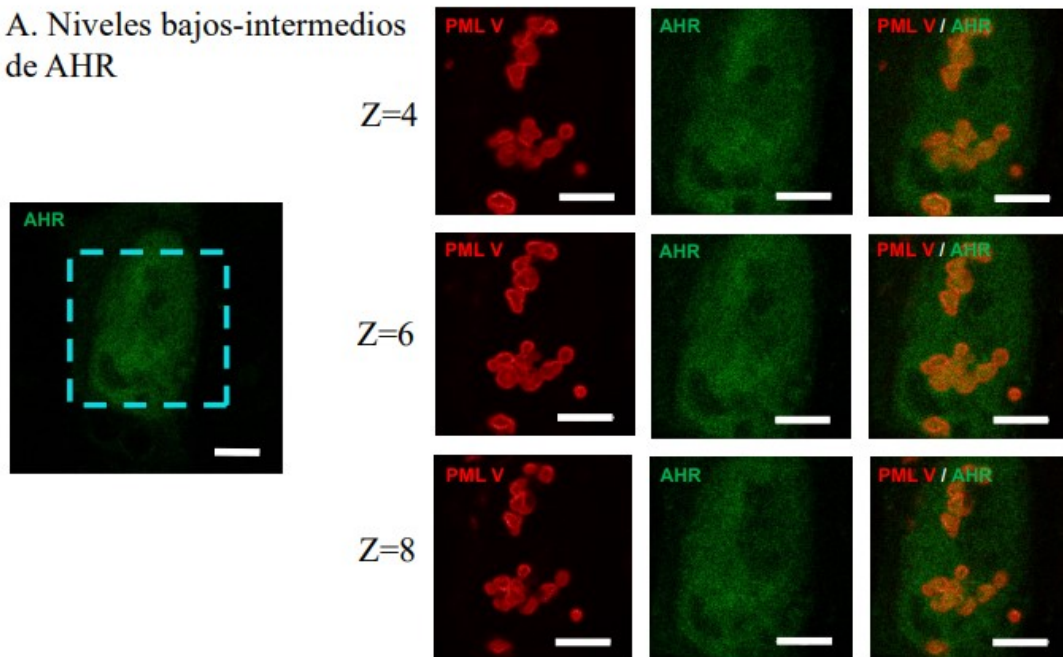


Figura 37. Localización de AHR en ensayos de co-transfección con PML V. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML V y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome V (Zeiss). (A) Las micrografías corresponden a la sección media de Z-stacks. (B) Proyección 3D generada a partir del Z-Stack. Las imágenes corresponden a una vista superior XYZ y a los planos ortogonales YZ y XZ. Los círculos punteados amarillos señalan sitios de co-localización entre PML VI y AHR (amarillo). Las flechas blancas señalan los “casquetes” de acúmulo de AHR en la periferia de los PML-NBs. La barra de escala corresponde a 5 μm en todas las imágenes. Amplificación 630X.

A. Niveles bajos-intermedios de AHR



B. Niveles altos de AHR

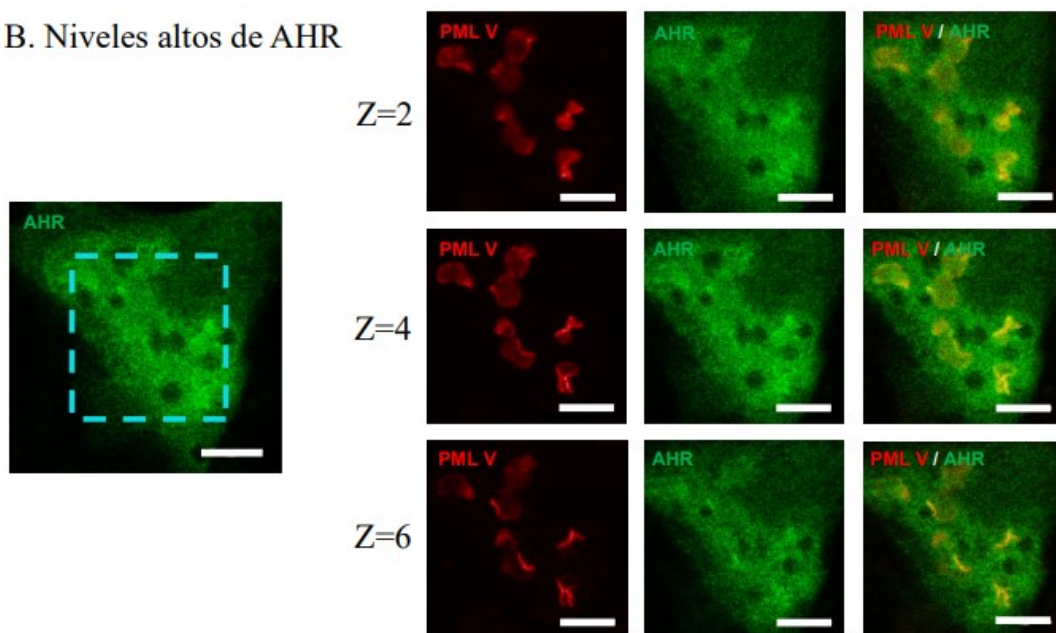


Figura 38. Análisis de co-localización de AHR con PML V en ensayos de co-transfección. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML V y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía STED de super resolución con microscopio Leica TCS SP8 STED-3X. Las micrografías corresponden a determinadas secciones de Z-stacks. El primer panel de imágenes (A) corresponde a una célula con niveles intermedios de expresión de AHR donde se incluyeron la capa media (Z=6) y dos capas por encima (Z=8) y dos por debajo (Z=4). Por otro lado, el panel de micrografías de (B) corresponde a los resultados obtenidos con una célula con niveles altos de expresión de AHR, en el que las capas del Z- stack incorporadas corresponden a la capa media (Z=4) y dos capas por encima (Z=6) y dos por debajo (Z=2). Las regiones delimitadas por los cuadrados punteados en cian indican las secciones con zoom para el análisis de la co-localización. La barra de escala corresponde a 5µm en todas las imágenes.

8. AHR y PMLVI co-localizan en ensayos de co- transfección

Los resultados sugieren fuertemente que AHR y PMLVI co-localizan a nivel nuclear (Figura 39A-B). La microscopía de super resolución (STED) permitió evidenciar que ambas señales parecen co-localizar y no sería producto de que un canal filtró sobre el otro canal (Figura 40). Asimismo, se pudo establecer que esta posible co-localización de AHR y PMLVI también ocurriría en células con diferentes niveles de expresión de AHR (Figura 40). Resulta interesante destacar que se pudo identificar que en ciertas zonas de la periferia de los PML-NBs se observa una mayor intensidad de la fluorescencia verde, formando un “casquete” alrededor de los PML-NBs(Figura 40). Los resultados en su conjunto indican que AHR es capaz de co-localizar con PMLVI en ensayos de co-transfección y que la potencial interacción entre las proteínas provocaría no sólo que AHR localice a nivel de los PML-NBs sino que a su vez forme una capa o casquete de acúmulo alrededor de los mismos.

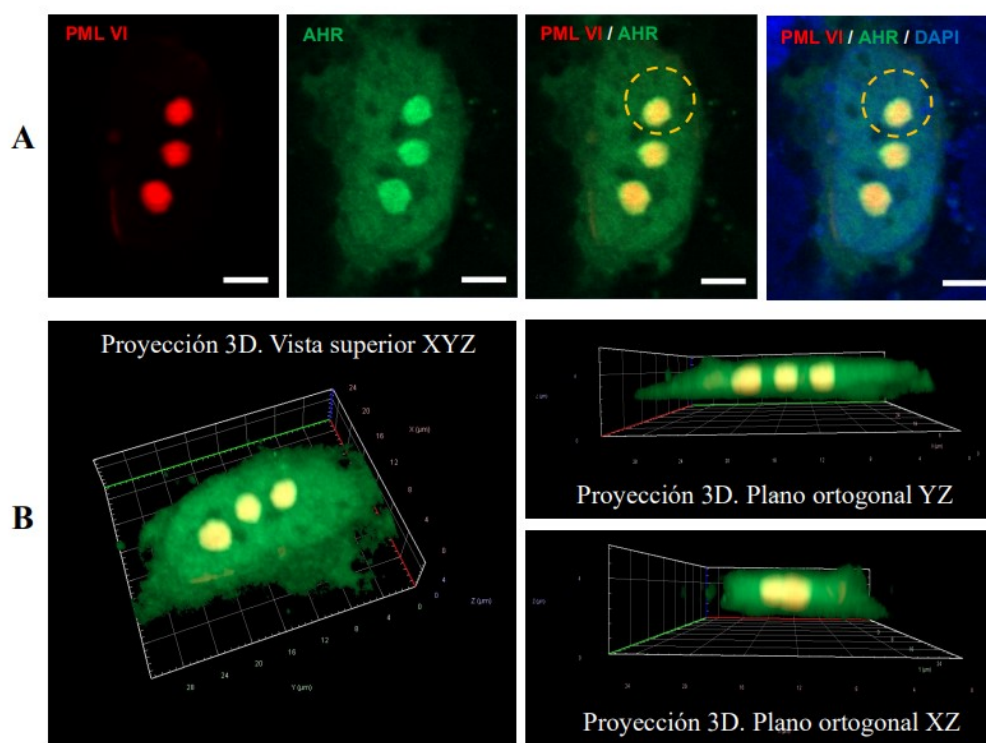


Figura 39. Localización de AHR en ensayos de co-transfección con PML VI. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML VI y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con microscopio ApoTome V (Zeiss). (A) Las micrografías corresponden a la sección media de Z-stacks. (B) Proyección 3D generada a partir del Z-Stack. Las imágenes corresponden a una vista superior XYZ y a los planos ortogonales YZ y XZ. Los círculos punteados amarillos señalan sitios de co-localización entre PML VI y AHR (amarillo). Las flechas blancas señalan los “casquetes” de acúmulo de AHR en la periferia de los PML-NBs. La barra de escala corresponde a 5μm en todas las imágenes. Aumento 630X.

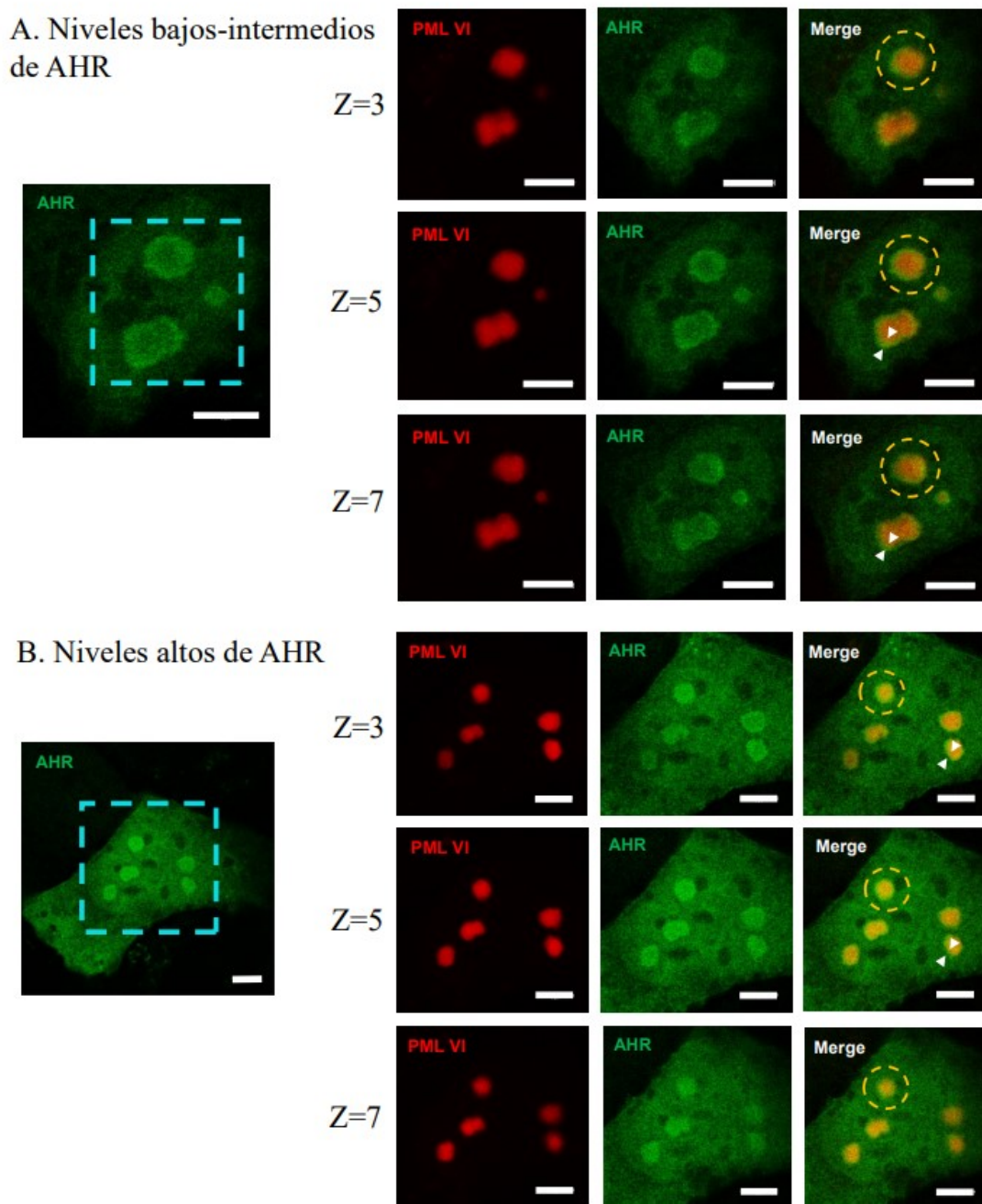


Figura 40. Análisis de co-localización de AHR con PML VI en ensayos de co-transfección. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML VI y egfp-AHR por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía STED de super resolución con microscopio Leica TCS SP8 STED-3X. Las micrografías corresponden a determinadas secciones de Z-stacks. Para este análisis se incluyeron la capa media (Z=5) y dos capas por encima (Z=7) y dos por debajo (Z=3). El primer panel de imágenes (A) corresponde a una célula con niveles intermedios de expresión de AHR, mientras que el panel de micrografías de (B) corresponde a los resultados obtenidos con una célula con niveles altos de expresión de AHR. Las regiones delimitadas por los cuadrados punteados en cian indican las secciones con zoom para el análisis de la co-localización. Los círculos punteados señalan sitios de co-localización entre PML VI y AHR (amarillo). Las flechas blancas señalan los “casquetes” de acúmulo de AHR en la periferia de los PML-NBs. La barra de escala corresponde a 5μm en todas las imágenes.

A partir de este ensayo pudimos corroborar por primera vez que AHR es capaz de co-localizar con PMLI, PMLIII, PMLVI y PML IV pero no con PMLV, lo cual indicaría que la interacción con PML sería isoforma dependiente. Actualmente estamos planeando la realización de ensayos de co-inmunoprecipitación de modo de corroborar la interacción de AHR con PML, en particular durante la infección por DENV.

9. *La distribución nuclear de NS5 de DENV-2 varía de acuerdo a los niveles de expresión de PML en ensayos de co- transfección*

Como se mencionó anteriormente, hace algunos años en nuestro laboratorio se pudo demostrar que NS5 de DENV es capaz de promover el desensamble de los PML-NBs [148,149]. Considerando que en esta tesis doctoral se pudo observar que el acúmulo de AHR en los PML-NBs no varía de acuerdo a los niveles de expresión de esta proteína, nos propusimos estudiar si los niveles y/o distribución de NS5 de DENV-2 se ven modificados a nivel nuclear en células que presentan diferentes niveles de expresión exógena de PML.

Para ello, células U2-OS fueron co-transfectadas con egfp-NS5 DV2 y rfp-PMLI y a las 24h de transfección, las mismas fueron fijadas y luego procesadas para microscopía de super-resolución (STED) con microscopio Leica.

Los resultados de este ensayo indican que NS5 co-localiza en PML-NBs, definido por la aparición de color amarillo en las micrografías correspondientes a la superposición de canales verde (NS5) y rojo (PMLI)(Figura 41 A-E), lo cual coincide con lo reportado en bibliografía [148,149]. Ahora bien, un aspecto interesante a destacar es que conforme aumentan los niveles de expresión de PML, se puede visualizar que NS5 comienza a co-localizar casi exclusivamente en los PML-NBs, fenómeno observado por la aparición de una mayor señal amarilla en las regiones correspondientes a los PML-NBs (Figura 41 A-E). Asimismo, se observa la aparición de acúmulos de señal verde en ciertas regiones nucleares definidas que indica que NS5 también localiza por fuera de los PML-NBs (Figura 41 A-E).

Estos resultados sugieren fuertemente que conforme aumentan los niveles de expresión de PML, el mismo terminaría reclutando en mayor medida a NS5 y removiéndolo de los sitios de acúmulo nuclear externos a los PML-NBs.

En la actualidad, numerosos estudios señalan que NS5 es capaz de alojarse en el nucleolo celular[21]. Por lo cual, visto y considerando que un análisis detallado de los sitios de localización de NS5 externos a los PML-NBs, nos permitió notar que dichas regiones nucleares eran compatibles con los nucleolos, decidimos intentar identificar si estas regiones correspondían efectivamente a los nucleolos celulares.

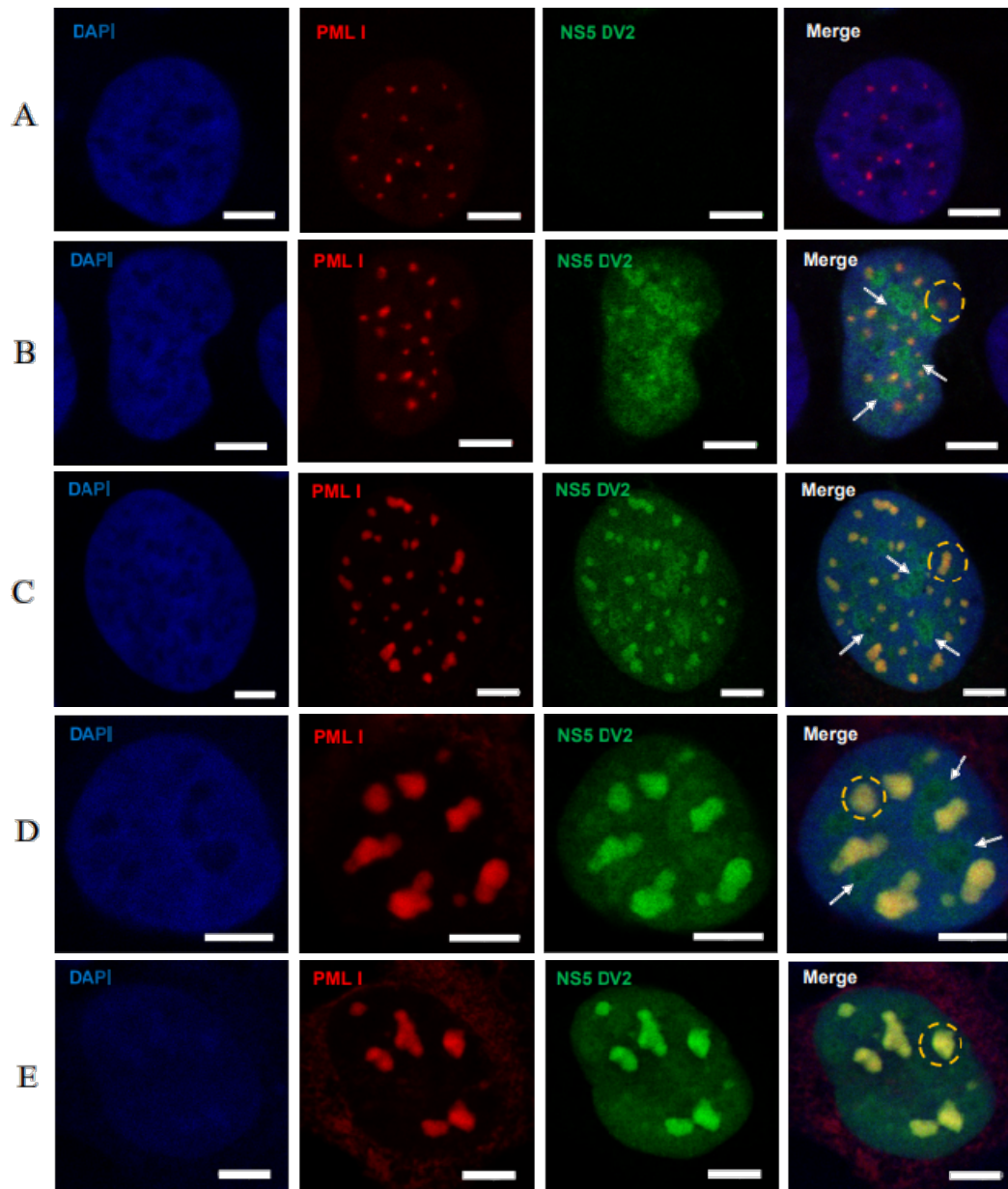


Figura 41. Localización de NS5 de DENV-2 en células con distintos niveles de PMLI en ensayos de co-transfección. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PMLI y egfp-NS5-DV2 por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El núcleo fue teñido con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía STED de super resolución con microscopio Leica TCS SP8 STED-3X. Las micrografías corresponden a la sección intermedia de Z-stacks. Cada fila de 4 imágenes corresponde a micrografías de diferentes células denominadas A,B,C,D y E. La primer fila, correspondiente a la célula “A” se encuentra únicamente transfectada con rfp-PMLI. A continuación, las sucesivas filas se encuentran organizadas de acuerdo al orden creciente de niveles de expresión de PML en la célula. Las regiones delimitadas por círculos punteados señalan sitios de co-localización entre PML I y NS5-DENV-2 (amarillo). Las flechas blancas señalan sitios de acúmulo de NS5 externos a los PML-NBs. La barra de escala corresponde a 5µm en todas las imágenes.

Para ello, se procedió a realizar ensayos en el que células U2-OS fueron co-transfectados con egfp-NS5 DV2 y rfp-PMLI. Transcurridas 24h de transfección, las células fueron fijadas con PFA 4% y las mismas fueron procesadas para ser analizadas por

microscopía de super resolución (STED). Para la detección de los sitios correspondientes al nucleolo decidimos teñir las células con anticuerpos que lo reconocieran específicamente (Figura 42).

Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar que efectivamente, NS5 es capaz de acumularse no sólo en los PML-NBs sino también en el nucleolo celular (Figura 42). Se pudo observar que la señal verde correspondiente a NS5 de DENV-2 co-localiza con la señal roja de PML I o con la señal blanca correspondiente a nucleolo (Figura 42).

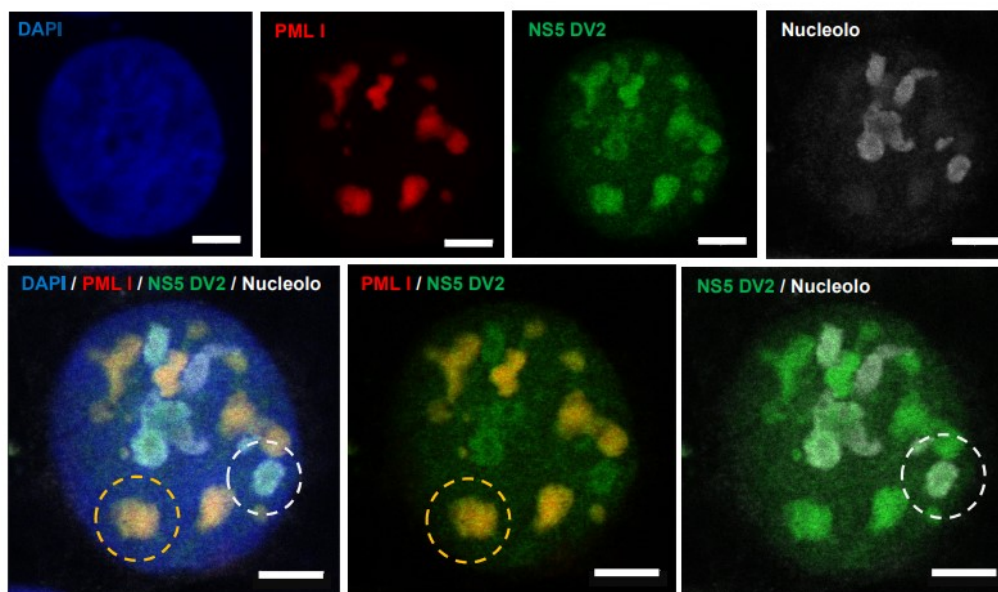


Figura 42. Análisis de co-localización nuclear de NS5 de DENV-2 en ensayos de co-transfección. Células U2-OS fueron co-transfectadas con rfp-PML I y egfp-NS5-DV2 por 24h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% por 10 min a temperatura ambiente. El nucleolo fue teñido con anti-nucleolina y el núcleo con DAPI. Los vidrios fueron montados con ProLong GOLD (R) con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía STED de super resolución con microscopio Leica TCS SP8 STED-3X. Las micrografías corresponden a la sección intermedia de Z-stacks. El panel superior de cuatro imágenes corresponde a los canales individuales mientras que el panel de tres imágenes inferior, corresponde a la superposición de los canales indicados en cada micrografía. Las regiones delimitadas por círculos punteados señalan sitios de co-localización entre PML I y NS5 de DENV-2 (amarillo) y entre NS5 de DENV-2 y nucleolo (blanco). La barra de escala corresponde a 5µm en todas las imágenes.

Con lo cual, en conjunto, los resultados indican que NS5 de DENV-2 es capaz de localizarse en los PML-NBs y nucleolo, pero en situaciones en que ocurriera un aumento de PML a nivel celular, esta proteína sería capaz de secuestrar la NS5 alojado en las regiones nucleolares. Estos hallazgos ponen de manifiesto la existencia de una distribución dinámica de NS5 a nivel nuclear y que la misma sería modulada en gran medida por los niveles de expresión de PML. Resulta importante destacar que, dado que dichos experimentos fueron realizados en Alemania durante el tiempo que duró la pasantía, lamentablemente no conté con el tiempo necesario para extender este ensayo a las demás isoformas de PML.

Capítulo II

MODELO PARCIAL

MODELO PARCIAL DEL CAPÍTULO II.

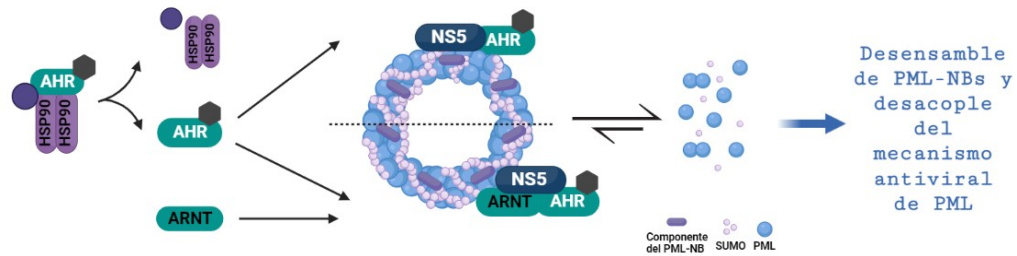


Figura 43. AHR y PML: interacción entre factores pro-virales y anti-virales durante una infección por DENV. El virus DENV induce la activación y la expresión de AHR durante la infección. Luego de su activación, AHR es capaz de translocar al núcleo e interactuar con PML. AHR sería capaz de promover el desensamblado de los PML-NBs al interactuar con NS5 en presencia o en ausencia de ARNT. Por otro lado, PML podría estar secuestrando a AHR para inhibir su actividad pro-viral.

Capítulo III

**Investigar la posible interacción de AHR
con el factor pro-viral Axl**

Capítulo III

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO III

INTRODUCCIÓN

AXL

1. Historia

Axl es una proteína codificada por un gen identificado por primera vez en el año 1988, en muestras de ADN humanas de pacientes que cursaban una leucemia mieloide crónica (LMC) [152,153].

En aquel entonces, al gen codificante de Axl se lo describió como un gen transformador de origen desconocido y lo denominaron *gen X* [152]. Algunos años más tarde, análisis de secuenciación del *gen X* permitieron determinar que el mismo codificaba para una proteína con características de receptor de tirosina kinasa, hallazgos que fueron confirmados por técnicas de clonado y biología molecular [153]. En el año 1991, el producto del *gen X* fue nombrado como *Axl*, término derivado de la palabra griega “*anexelekto*” que significa “no controlado o descontrolado” y que hace alusión al estado del gen y de la proteína en pacientes con LCM [153]. Desde su descubrimiento hasta la actualidad, se ha estudiado en profundidad este receptor y ha podido describirse que Axl es capaz de regular un amplio abanico de funciones y procesos biológicos, que incluyen desde intervenir en la regulación del crecimiento celular y diferenciación, hasta su capacidad de regular la respuesta inmune [154].

En la siguiente sección se abordarán los aspectos más importantes de la biología molecular y la bioquímica de Axl, su relevancia a nivel de la regulación de la respuesta inmune y su rol emergente como proteína clave durante infecciones virales.

2. Biología molecular y bioquímica de Axl

Axl es una proteína perteneciente a la familia TAM (Tyro3, Axl y Mer) de receptores de tirosina kinasa, ampliamente conocida por llevar a cabo funciones importantes a nivel del sistema nervioso y como moduladores del sistema inmune [155].

Axl es una proteína transmembrana que cuenta con un dominio extracelular o ectodominio, una región transmembrana y un dominio intracelular. La porción extracelular de este receptor cuenta con dos módulos principales. En la región amino terminal de la proteína se localiza el dominio Ig, caracterizado por una serie de dominios en *tandem* relacionados a inmunoglobulinas que llevan a cabo el reconocimiento y la unión del ligando [155–157]. A continuación, se disponen una serie de repeticiones en *tandem* de fibronectina de tipo III, por lo que dicha región se denomina dominio FNIII [153,155,158]. Por otro lado, la porción intracelular del receptor cuenta con un dominio catalítico de tirosina kinasa que luego de la

homo-o hetero- dimerización del receptor, se activa, se autofosforila y desencadena una cascada de señalización intracelular dependiente de fosforilaciones (Figura 44).

La activación de Axl desencadena, al igual que la mayoría de los receptores asociados a tirosina kinasa (RTK), una vía de señalización dominada por la fosforilación y la activación de la vía PI3K/Akt. La subsecuente activación de la vía de Akt, termina confiriéndole a Axl la habilidad de intervenir en la regulación de distintos procesos celulares, tales como impactar en la sobrevivencia celular, la proliferación y consecuentemente en la actividad de PKC. Esto último, interviene en la movilización de componentes del citoesqueleto, como lo es la actina, requisito indispensable para la que la célula pueda llevar a cabo la fagocitosis de las células apoptóticas (CA) [155].

Existen dos ligandos endógenos de los receptores de tipo TAM: el factor específico de arresto del crecimiento 6 (growth arrest-specific 6; Gas6) y la Proteína S (Pros1) [155,159]. Gas6 y Pros1, son moléculas de alto peso molecular (~80kDa), de naturaleza proteica, comparten cerca de un 42% de homología de secuencia y exhiben una distribución espacial semejante en términos de la configuración de sus dominios moleculares[155]. No obstante, Gas6 y Pros1 presentan afinidades diferenciales por los distintos receptores de tipo TAM. Gas6 funciona como un ligando de los tres receptores, pero con una afinidad unas 50 veces mayor para Axl. En contraste, Pros 1 parece unir a Tyro3 y Mer, pero no a Axl [155]. Por lo que a continuación nuestro trabajo se enfocará principalmente en el estudio del eje Gas6-Axl.

Estructuralmente Gas6 presenta dos regiones características que son importantes para su bioactividad. En su extremo carboxilo-terminal, se ubica el dominio SHBG, un dominio globulina de unión a hormonas sexuales (sex hormone-binding globulin; SHBG) compuesto por laminina G. El dominio SHBG es reconocido y unido por el dominio Ig de los receptores de tipo TAM y es el responsable de promover la dimerización y la consecuente activación de los mismos. Por otro lado, en el extremo amino-terminal de la proteína se posiciona el denominado dominio Gla. El mismo se encuentra enriquecido con residuos de ácido glutámico cuyos grupos γ -hidroxilo son carboxilados post-traduccionalmente en forma vitamina K-dependiente. La γ -carboxilación de Gla es la que permite que Gas6 sea capaz de unir fosfatidilserina (FS) [155]. La habilidad de unir FS expuesta por las células apoptóticas (CA), permite que Gas6 actúe como puente entre esas estructuras y Axl, induciendo consecuentemente la fagocitosis de las CA[155].

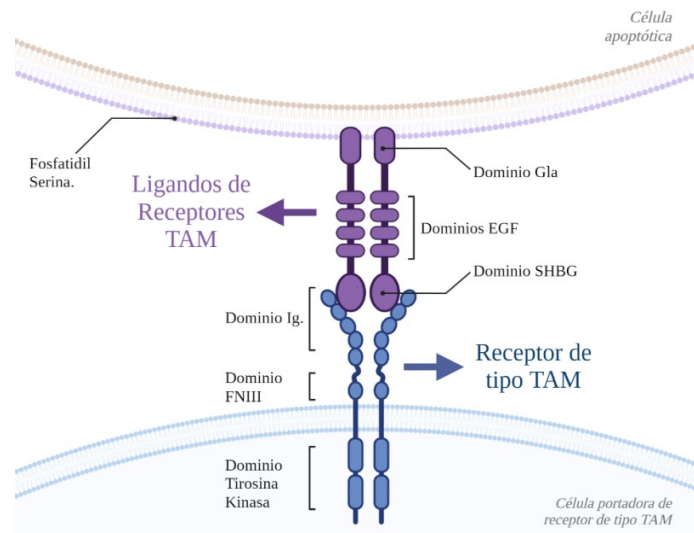


Figura 44. Esquema de receptores de tipo TAM y sus ligandos. Este esquema fue basado y adaptado a partir del trabajo Lemke. Et al 2013. Biology of TAM receptors.

Axl presenta una expresión ubicua, sin embargo se encuentra preferencialmente expresado en células maduras del sistema inmune, el sistema nervioso, el sistema vascular y aparato reproductivo ([155] and The Human Protein Atlas).

Respecto al sistema inmune, se ha descrito que Axl es un inhibidor pleiotrópico de la respuesta inflamatoria innata contra los patógenos. La activación de Axl reprime la señalización de IFN tipo I en macrófagos y células dendríticas [155,160]. Asimismo, Axl, a través de SOCS (supresor de la señalización de citoquinas) y Twist, regula la activación de los TLR, contrarrestando las vías de señalización NFkB e IFN tipo I [155,160,161].

Asimismo, se ha descubierto que existe una asociación íntima entre los receptores de tipo TAM y los receptores de interferón de tipo I (IFNAR) tanto en macrófagos como en células dendríticas y otras células centinela del sistema inmune [155,158,162,163]. Se ha reportado que los receptores de tipo TAM son capaces de formar complejos con IFNAR a nivel de la membrana plasmática. La activación de receptores de tipo TAM por parte de Gas6 en células dendríticas, provoca una inhibición de la vía de TLR, una supresión de la vía de señalización de IFNAR y finalmente una abolición de la respuesta inflamatoria en las células. [155,158,163].

Axl está implicado en la remoción de células apoptóticas (AC) a través de fagocitosis y este fenómeno ha sido abordado con especial interés en el campo de la virología, debido a que Axl podría actuar de receptor de entrada viral para virus envueltos en un proceso denominado como “mimetismo apoptótico”[155].

Recientemente, ha surgido la importancia de Axl como potencial receptor de entrada de los flavivirus tales como ZIKV y el virus del Nilo Occidental [164,165].

Respecto de la infección por DENV, se ha estudiado y descrito muy recientemente que Axl presenta un importante rol como receptor de entrada de DENV en distintos modelos celulares, tanto en líneas celulares establecidas como en cultivos primarios de células humanas [164,165].

Ha sido reportado que la expresión exógena de Axl en células moderadamente susceptibles a la infección por DENV, como lo es la línea celular Hek293T, incrementa en forma significativa la infección por distintos serotipos de DENV a las 48hpi [165]. Por otro lado, se observó por citometría de flujo que el bloqueo de Axl con anticuerpos en cultivos celulares de A549 (línea celular susceptible a la infección por DENV que presenta una elevada expresión endógena de Axl) provocó una reducción significativa en la unión del virus a la célula y consecutivamente una disminución de la infección a las 48h [165]. Aún más importante, el silenciamiento de Axl en células A549 mediante el uso de siRNAs, logró una disminución de la infección por DENV a las 24hpi [165].

Asimismo, ha sido reportado que el reconocimiento de DENV por parte de Axl ocurre en forma indirecta, donde Gas6 es una proteína crucial, que auspicia de puente entre el virus y el receptor. En otras palabras, ha sido descrito que DENV debe unirse a Gas6 para poder ser reconocido por Axl y que este receptor sea capaz de promover la endocitosis de la partícula viral [165].

Cabe destacar, que estudios llevados a cabo en células que expresaban en forma exógena o bien Axl wt (wild type) o bien Axl con mutaciones en la cola carboxilo terminal, donde se encuentra el dominio tirosina kinasa, revelaron que el dominio extracelular del receptor y la actividad catalítica del dominio intracelular son relevantes a distintos niveles durante el proceso de entrada del virus. Se pudo poner en evidencia que la actividad tirosina kinasa es importante para el aumento de la infección por DENV en forma dependiente de Axl. No obstante, la integridad de dicho dominio catalítico es dispensable para la correcta endocitosis de la partícula viral. Las células que expresaban Axl carente del dominio de tirosina kinasa son capaces de endocitar las partículas virales con una eficiencia semejante a la de las células con el Axl no mutado; sin embargo, a las 48h de la infección, las células presentan una menor tasa de replicación viral respecto de las células con Axl (wt) [165].

Los antecedentes previamente citados, indican que Axl es un importante factor pro-viral durante la infección por DENV y que estaría desempeñando un rol crucial durante la infección a nivel de la entrada viral y durante el ciclo de infección celular [165]. En conjunto, todas estas características hacen de Axl un interesante factor celular con un gran potencial para convertirse en un blanco antiviral.

En cuanto a la regulación de Axl, los ratones expuestos al denominado “humo de segunda mano” o *second hand smoke* (SHS), que refiere al humo que inhala un fumador pasivo al encontrarse en la cercanía de una persona que se encuentra fumando, presentan una mayor activación de Axl en los pulmones [166].

Ha sido reportado que compuestos presentes en el humo de los cigarrillos activan al AHR, el sensor medioambiental por excelencia [37,167]. Por otro lado, ha sido publicado que ligandos de AHR son capaces de modular la expresión de las proteínas TAM en macrófagos deficientes en TAM [161]. Adicionalmente, las vías de señalización de AHR y Axl podrían interactuar, ya que ambas proteínas están implicadas en la regulación negativa de las vías de señalización NFkB e IFN tipo I a través de diferentes mecanismos durante el lupus eritematoso sistémico[161].

Estos hallazgos sugieren fuertemente que AHR podría ser un regulador de la expresión de Axl, lo que implica que Axl podría ser susceptible de cambios después de ciertos estímulos ambientales y que la activación de ambas vías de señalización podría tener una contribución sinérgica a la supresión de la respuesta antiviral, que podría ser un factor clave asociado a una exacerbación de la infección por DENV.

Explorar la importancia de Axl y su regulación durante la infección *in vitro* por DENV, se convierte en un proyecto prometedor que nos proporcionará pruebas de los posibles mecanismos implicados y, además, contribuirá a entender cómo el entorno podría estar influyendo en la expresión de Axl, la infección por DENV y el resultado de la enfermedad. En este capítulo nos propusimos evaluar el impacto de la modulación farmacológica de AHR en la expresión de Axl y su relevancia durante la infección *in vitro* por DENV.

Capítulo III

RESULTADOS

RESULTADOS

El hecho de que AHR promueva la infección por DENV podría ser, en principio, por dos grandes mecanismos no excluyentes entre sí: o bien por la supresión de la respuesta inmune antiviral o bien por propiciar un aumento de la entrada del virus a la célula, y con ello, de la infección viral.

En el presente capítulo se abordará el estudio de la posible interacción entre AHR y Axl, un conocido candidato a receptor de entrada viral de flavivirus y una proteína descrita como importante factor pro-viral durante la infección por DENV y ZIKV.

Dado que AHR y Axl son factores pro-virales durante la infección por DENV, nos propusimos investigar la posible interacción entre ambas vías de señalización.

1. DENV promueve la expresión de Axl y Gas6 durante la infección

En los últimos años se ha reportado que Axl presenta efectos pro-virales durante la infección por DENV [165,168], y que el bloqueo de Axl restringe la replicación del DENV *in vitro*, lo que pone de manifiesto la importancia de este receptor durante la infección [165,168]. Sin embargo, hasta el momento no ha sido analizado el estado de Axl durante la infección. Con motivo de estudiar si la infección por DENV impacta en los niveles de expresión de Axl, células A549 fueron infectadas con DENV-2 durante 24h ó 48h. Las monocapas celulares infectadas se cosecharon para procesarse por RT-qPCR o se recolectaron para llevar a cabo análisis por citometría de flujo (FACS), a las 24hpi y a las 48hpi respectivamente (Figura 45).

Los resultados obtenidos indican que células infectadas con DENV presentan mayores niveles de ARNm de Axl a las 24hpi (Figura 45A) y exhiben mayores cantidades de proteína total de Axl a las 48hpi, en comparación con el control (Figura 45C). Estos resultados demuestran por primera vez que el DENV aumenta la expresión de Axl. Por otro lado, se observó el mismo efecto a nivel de Gas6. Células infectadas con DENV-2 contienen niveles mayores de ARNm de Gas6 a las 24hpi (Figura 45C) y presentan un incremento en los niveles proteicos totales a 48hpi (Figura 45D).

Los resultados en su conjunto evidencian por primera vez que DENV es capaz de promover la expresión tanto de Axl como de su ligando Gas6, lo cual reviste crucial interés por ser proteínas que intervienen en la etapa de entrada de DENV a la célula, y por facilitar la replicación.

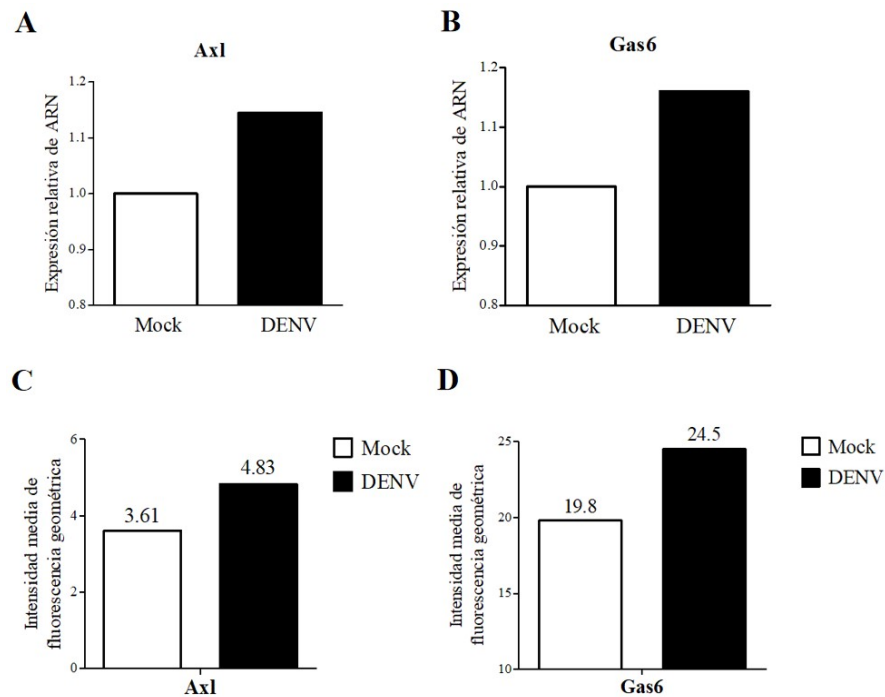


Figura 45. La infección por DENV promueve la expresión de Axl y Gas6. Células A549 fueron inoculadas con vehículo (mock) o con DENV-2(MOI=0,5). Se cosecharon muestras a las 24hpi para procesarse por RT-qPCR (A,B) o a las 48hpi para procesarse por FACS (C,D). Los gráficos corresponden a los siguientes resultados: mRNA de Axl(A), mRNA Gas6(B), niveles proteicos totales Axl (C), niveles proteicos totales Gas6 (D). Para los resultados de RT-qPCR se graficó el valor medio de la expresión relativa de ARN (veces de cambio), mientras que para los resultados de FACS, se graficaron los valores de intensidad media de fluorescencia geométrica (IMFg).

2. AHR regula la expresión de Axl en ausencia de infección

En esta tesis hemos podido describir que AHR es un factor de transcripción activado durante la infección por DENV que cumple un rol pro-viral fundamental durante la infección. Dado que Axl también es un factor pro-viral durante la infección por DENV, y que pudimos demostrar que durante la infección se encuentra sobre-expresado, nos preguntamos si DENV era capaz de regular la expresión de Axl a través de la activación de AHR.

En primer lugar decidimos investigar si AHR es capaz de regular la expresión de Axl en ausencia de infección. Por este motivo, se procedió a realizar ensayos con un sistema reportero del promotor de Axl que permitiera evaluar el impacto de AHR sobre la expresión de Axl *in vitro*.

Para ello, cultivos celulares de Hek293T fueron transfectados con un plásmido reportero del promotor de Axl (Axl-promotor-luciferasa) y con un plásmido control (Figura 46A) previo a su tratamiento con los moduladores de AHR. Luego de la transfección, las células fueron tratadas por un lapso de 24h con moduladores de AHR y finalmente se realizó la medición de la luminiscencia. Los detalles correspondientes al procedimiento experimental se abordan en la sección *Materiales y Métodos*. Los resultados se grafican en la Figura 46B.

Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar por primera vez que AHR es capaz de modular la actividad del promotor de Axl en ausencia de infección (Figura 46).

La administración de kynurenina, un agonista de AHR, aumenta significativamente la actividad del promotor de Axl en comparación con el control (Figura 46B). Por el contrario, la inhibición del AHR con CH223191 disminuye la actividad del promotor de Axl en un 65% en comparación con el control (Figura 46B).

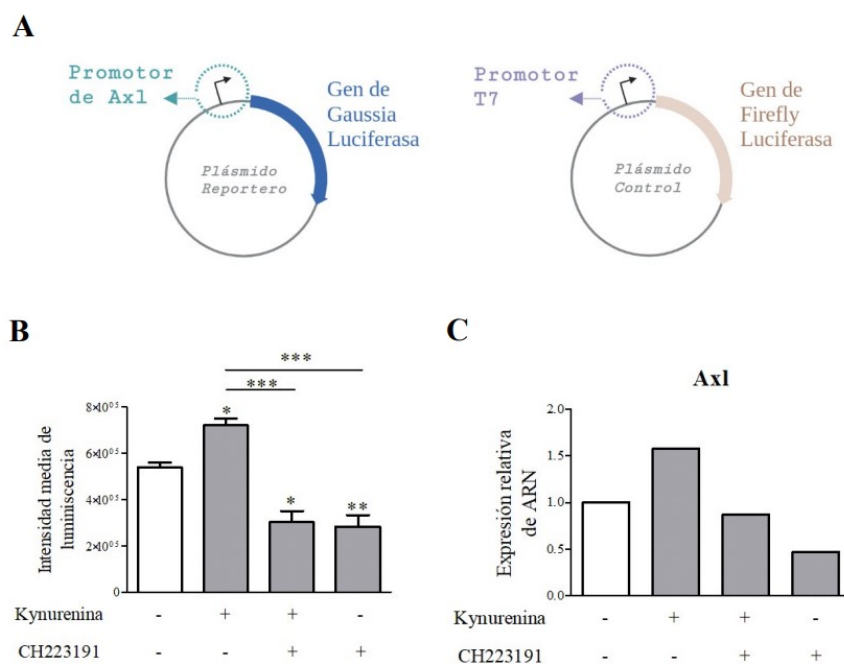


Figura 46. AHR regula la expresión de Axl. (A) Esquema simplificado de los plásmidos empleados para los ensayos reporteros de la actividad del promotor de Axl. (B) Células Hek293T fueron co-transfectadas con un plásmido codificante para el promotor de Axl *up-stream* del gen de la luciferasa (Axl-Promotor-Luc) y con un plásmido reportero control (Ctrol-T7-Luc). Al cabo de 24h, las células fueron tratadas con distintas combinaciones de kynurenina (agonista de AHR) y CH223191 (antagonista de AHR). Luego de 24h de tratamiento, se cosecharon las muestras para procesar y medir la luminiscencia. Se graficó la intensidad media de luminiscencia $\pm$ SEM. El análisis estadístico se realizó mediante one-way ANOVA seguido de Tukey's post-test. Se consideró significativo $p < 0.05$. (C) Células Hek293T fueron tratadas con distintas combinaciones de kynurenina (agonista de AHR) y CH223191 (antagonista de AHR). Luego de 24h de tratamiento, se cosecharon las monocapas celulares para procesarse por RT-qPCR. Para los resultados de RT-qPCR se graficó el valor medio de la expresión relativa de ARN (veces de cambio)

Por otro lado, el tratamiento combinado de kynurenina con CH223191 mostró una actividad del promotor de Axl un 30% menor en comparación con el control. Asimismo, este valor es significativamente menor que en el caso del tratamiento con kynurenina y significativamente mayor que en el caso del tratamiento con CH223191, lo que indica que la kynurenina es capaz de promover la activación del promotor de Axl, aunque la concentración empleada no contrarresta completamente el efecto inhibitorio de CH223191 (Figura 46B).

Para investigar en mayor profundidad si el efecto observado a nivel del promotor de Axl impacta en los niveles de ARNm de Axl, células Hek293T fueron tratadas durante 24h

con medio, kynurenina, CH223191 o una combinación de ambas. Al cabo de 24h las muestras fueron cosechadas y procesadas por RT-qPCR (Figura 46C).

La administración del agonista del AHR aumentó la expresión de Axl en un 15%, mientras que el antagonista del AHR CH223191 redujo la expresión hasta en un 50% en comparación con el control (Figura 46C). Más importante aún, el tratamiento combinado de kynurenina y CH223191, presentó un nivel de ARNm de Axl intermedio, en comparación con las condiciones de un tratamiento simple con kynurenina o CH223191 (Figura 46C).

Los resultados obtenidos en conjunto indican que AHR efectivamente es capaz de modular la expresión de Axl. AHR regula la actividad del promotor de Axl y consecuentemente los niveles de expresión de su ARN mensajero.

3. El ARN sintético regula la expresión de Axl en forma dependiente de AHR

Para explorar en mayor profundidad si este fenómeno ocurre durante una infección por virus con genoma de ARN, se realizaron ensayos en los que cultivos celulares de Hek293T fueron tratados con poly I:C, un análogo de ARN que permite emular la infección en forma más sencilla. En particular, se empleó poly I:C (20µg/ml) por ser una concentración caracterizada por inducir la activación de la vía de señalización de AHR, y promover cambios en el tráfico intracelular y los niveles de expresión de AHR. (*Ver Capítulo I y Capítulo II*).

En principio, se procedió a realizar ensayos con el sistema reportero del promotor de Axl previamente descrito. En esta oportunidad, luego de la transfección de los plásmidos, las células fueron tratadas con medio o con poly I:C, en presencia o en ausencia de CH223191 (Figura 47A).

En primer lugar, se puede observar que poly I:C, fue capaz de desencadenar la activación del promotor de Axl (Figura 47A). De hecho, la administración de poly I:C (20µg/ml) aumentó la actividad del promotor de Axl en un 40% respecto del control (Figura 47A). Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con la combinación de poly (I:C) y CH223191, se pudo observar una drástica disminución de la actividad del promotor de Axl (Figura 47A). La administración conjunta de ambos tratamientos disminuyó la actividad del promotor en un 53% respecto del mock, y provocó una reducción de aproximadamente un 66% respecto de la condición poly I:C (20µg/ml) (Figura 47A). Resulta importante destacar que los niveles observados en la condición en que se administró una combinación de poly I:C y CH223191 fueron equivalentes a los observados con el tratamiento con CH223191 (Figura 47A).

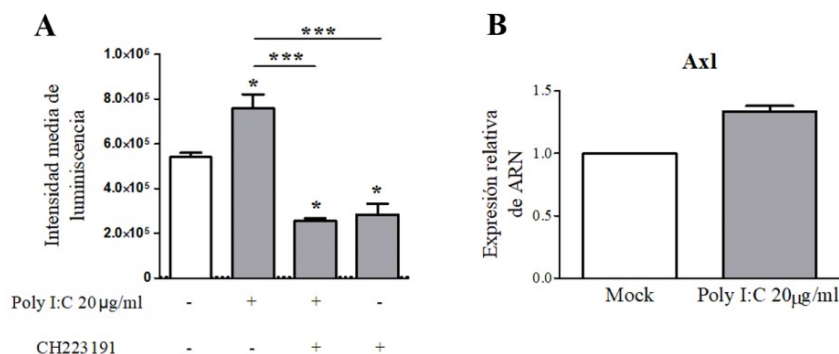


Figura 47. Poly I:C regula la expresión de Axl. (A) Células Hek293T fueron co-transfectadas con un plásmido codificante para el promotor de Axl up-stream el gen de la luciferasa (Axl-Promotor-Luc) y con un plásmido reportero control (Ctrol-T7-Luc). Al cabo de 24h, las células fueron tratadas con distintas combinaciones de poly I:C (20 µg/ml) y CH223191 (antagonista de AHR). Luego de 24h de tratamiento, se cosecharon las muestras para procesar y medir la luminiscencia. Se graficó la intensidad media de luminiscencia $\pm$ SEM. El análisis estadístico se realizó mediante one-way ANOVA seguido de Tukey's post-test. Se consideró significativo un p valor < 0.05 . (B) Células Hek293T fueron tratadas con vehículo (mock) o con poly I:C (20 µg/ml). Luego de 24h de tratamiento, se cosecharon las monocapas celulares para procesarse por RT-qPCR. Para los resultados de RT-qPCR se graficó el valor medio de la expresión relativa de ARN (veces de cambio)

Estos resultados sugieren fuertemente que la inducción de la expresión de Axl desencadenada por poly I:C es, al menos parcialmente, mediada por la activación de la vía de AHR.

Adicionalmente, se procedió a evaluar si el tratamiento con poly I:C es capaz de impactar en los niveles de expresión del ARNm de Axl. Para ello se trataron células Hek293T con medio o con poly I:C (20 µg/ml) y al cabo de 24h, se realizó la cosecha de muestras y su procesamiento por RT-qPCR. Los resultados se grafican en la Figura 3B.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con poly I:C (20 µg/ml) por un lapso de 24h es capaz de promover el aumento de Axl medido por RT-qPCR (Figura 47B). Cabe destacar que dicha concentración, también fue la única capaz de activar la vía de señalización de AHR (*Ver Capítulo I*), evaluada como el aumento no sólo del ARNm de AHR sino de sus genes blanco canónicos: CYP1A1 y CYP1B1.

Estos resultados en conjunto, sugieren una correlación entre la activación de la expresión de Axl y la actividad de AHR, sugiriendo que el efecto de poly I:C a nivel de Axl, podría deberse, al menos parcialmente, a la activación de la vía de AHR. El hecho de que poly I:C sea capaz de activar AHR y con ello, aumentar la actividad del promotor de Axl y los niveles de expresión de ARNm de Axl, podría significar que durante una infección por DENV, el genoma viral también sería capaz de gatillar este eje regulador. En este escenario, el ARN viral al activar TLR3 promovería la activación de AHR y con ello el incremento en la expresión de Axl. Este, podría ser uno de los mecanismos involucrados en el aumento de la expresión de Axl durante la infección por DENV.

4. AHR regula la expresión de Axl durante una infección por DENV

Con motivo de indagar si estos fenómenos también tienen lugar durante una infección por DENV, se procedió a evaluar el impacto de la modulación farmacológica de AHR en la expresión de Axl y de Gas6 en células infectadas con el virus. Para ello, se contó con células A549 que fueron tratadas con agonistas o antagonistas de AHR previo a la infección con el virus, luego las células fueron infectadas con DENV-2 (MOI=0.5) y 24hpi se realizó la cosecha de muestras para evaluar por RT-qPCR (Figura 48).

En principio, se observó que células expuestas a I3S antes de la infección, presentan un aumento del ARNm de Axl de hasta 4 veces respecto de los niveles registrados en células infectadas pero no tratadas con I3S (Figura 48A). Dado que el tratamiento con I3S, se desarrolló 24h previo a la infección con el virus, estos resultados sugieren que la infección por DENV en un contexto en que ya haya ocurrido una exposición a un agonista de AHR terminaría generando un estado celular que induciría un aumento aún mayor en la expresión de Axl. Sorpresivamente, células pre-tratadas a I3S e infectadas con DENV, presentan niveles de mRNA de Gas6 equivalentes a los encontrados en el control (Figura 48B).

Por otro lado, la administración de CH223191 previo a la infección con el virus termina generando el efecto opuesto. Se puede observar que células pre-tratadas con CH223191 y posteriormente infectadas con DENV por 24h, exhiben una disminución en la expresión de Axl en un 40% y de Gas6 en un 60%, respecto del control (Figura 48C-D).

Estos resultados en conjunto indican que la vía de AHR es capaz de regular la expresión de Axl y su ligando, independientemente del estado de infección de la célula. En otras palabras, AHR es capaz de modular la expresión de Axl y Gas6 en condiciones basales tanto como durante una infección por DENV.

Resulta interesante destacar el efecto sinérgico que presenta una exposición a un agonista de AHR previo a la infección por el virus junto con la infección en sí a nivel de la expresión de Axl. El gran aumento de la expresión de Axl en este contexto podría estar vinculado a un aumento de la entrada del virus en ciclos subsiguientes de infección y esto podría estar directamente relacionado con el desarrollo de una gran diversidad de cuadros clínicos por DENV.

El siguiente paso en nuestra investigación fue evaluar si los cambios observados a nivel de Axl y Gas6 en términos de mRNA terminaban repercutiendo en la expresión de las proteínas. Para ello se emplearon células A549 que fueron pre-tratadas con agonistas o antagonistas de AHR previo a la infección con DENV-2 y a 48hpi las células fueron cosechadas y preparadas para su procesamiento por citometría de flujo (Figura 49).

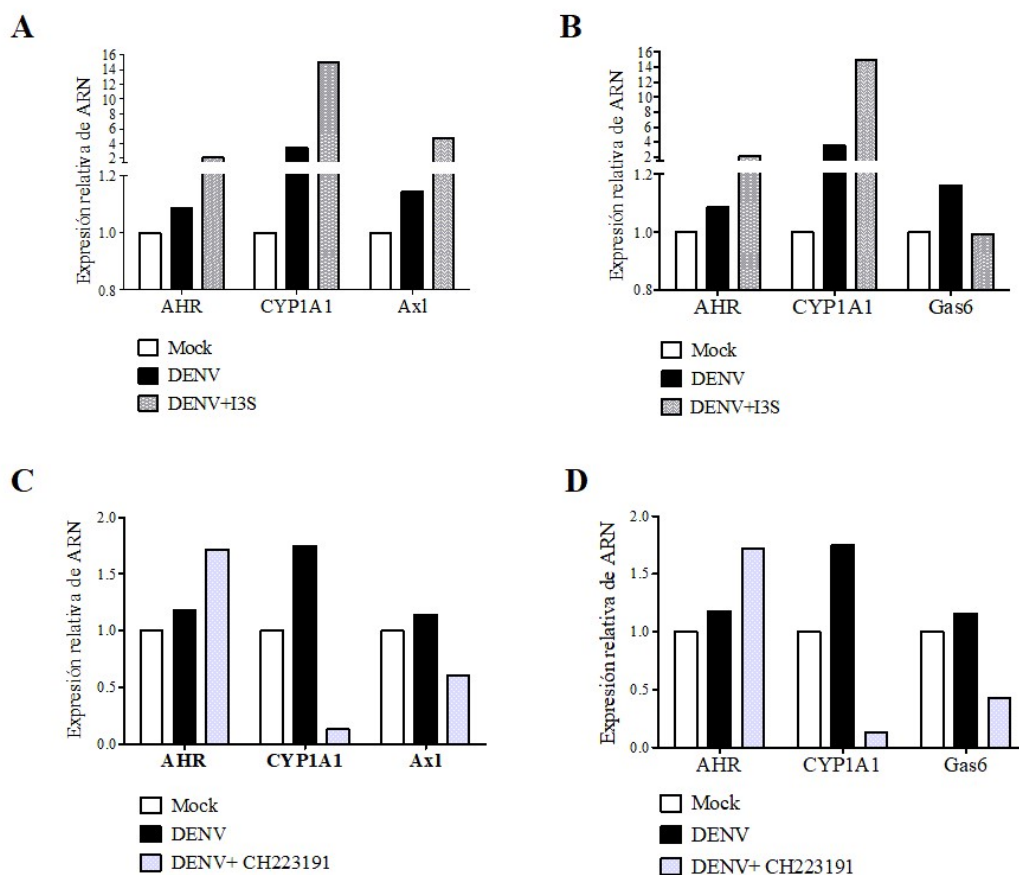


Figura 48. AHR regula la expresión de Ax1 y Gas6 durante una infección por DENV. Células A549 fueron pre-tratadas con I3S 10 μ M (A,B) o pre-tratadas con CH223191(C,D) y posteriormente infectadas con DENV-2-(MOI=0,5). Se cosecharon muestras a las 24hpi para procesarse por RT-qPCR. En todas las muestras se determinó el estado de la vía de señalización de AHR. (A,C) mRNA de AHR, CYP1A1 y Ax1 mientras que (B,D) mRNA de AHR, CYP1A1 y Gas6. Se graficó el valor medio de la expresión relativa de ARN (Veces de cambio).

Los resultados obtenidos evidenciaron que tanto DENV como AHR tienen un impacto en los niveles de expresión de la proteína Ax1 a las 48hpi medido por FACS (Figura 49). De hecho, la exposición a la kynurenina antes de la infección, provoca un aumento aún mayor en los niveles totales de Ax1 en comparación con las condiciones control (mock), DENV y kynurenina (Figura 49A).

Por otro lado, en lo referido a Gas6, se pudo observar que si bien, células tratadas con kynurenina e infectadas con DENV presentan mayores niveles de Gas6 respecto del tratamiento con kynurenina, los niveles de ambos tratamientos resultaron ser menores respecto de los registrados para células sin infectar (mock) y el control viral (Figura 49B). Esto, refleja que si bien AHR y DENV podrían regular la expresión de Gas6, dicha regulación sería diferente a la observada para Ax1.

Cabe destacar, que en esta instancia se realizó una determinación de Ax1 y Gas6 total, sin poder discernir si existen diferencias en la distribución celular de dichas proteínas. Resulta

interesante mencionar, que se puede visualizar un aumento del nivel de ambas proteínas aún cuando esta línea celular tiene un alto nivel basal de expresión de ambas.

Curiosamente, cuando se pre-trataron células con CH223191 previo a la inoculación de vehículo o la infección con DENV, las células exhibieron niveles proteicos de Axl y Gas6 menores respecto los registrados en las condiciones de control (mock) y DENV (Figura 49).

Estos resultados sugieren que si bien AHR es capaz de regular la expresión de ambas proteínas y que la infección por el virus en sí misma promueve la expresión de las proteínas, esta sobre-expresión de Axl y Gas6, dependería parcialmente de AHR, ya que independientemente del estado de activación del receptor, células infectadas presentan niveles ligeramente mayores de expresión de las proteínas (Figura 49).

5. Axl regula la expresión de AHR

Los resultados de este capítulo hasta el momento indican no sólo que DENV es capaz de promover la sobre-expresión de Axl durante la infección, sino que además este aumento de la expresión de Axl y Gas6 estaría mediado, al menos en forma parcial por AHR. Por otro lado, hemos podido demostrar que AHR es capaz de regular la expresión de Axl en presencia y en ausencia de infección. Estos resultados constituyen las primeras evidencias que apoyan el hecho que de ambas vías de señalización interactúan entre sí, y en particular, durante la infección. Nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar el posible impacto de la modulación farmacológica de Axl en la expresión de AHR, para seguir profundizando nuestros conocimientos acerca de la interacción entre ambas vías de señalización.

Con motivo de estudiar el efecto de Axl en la expresión de AHR, células A549 fueron tratadas con medio, con R428, un inhibidor selectivo de la actividad de tirosina kinasa de Axl, con el inhibidor de AHR CH223191 o con una combinación de las drogas. A continuación las células fueron inoculadas con medio o con DENV-2 y a 24hpi las células fueron cosechadas para procesarse por RT-qPCR (Figura 50).

Resulta importante remarcar que los resultados obtenidos deberían analizarse en dos contextos diferentes. Axl parecería afectar de una forma la expresión de ARNm de AHR en ausencia de infección pero parecería tener otro impacto durante la infección por DENV.

En primer lugar, se pudo observar por primera vez que Axl impacta en la regulación de la expresión de AHR. Células tratadas con R428, el antagonista de Axl, presentan un aumento total de unas 8 veces en los niveles de expresión de AHR respecto del control (Figura 50A). Lo cual indicaría que es posible que Axl se encuentre cumpliendo un rol regulatorio negativo de los niveles de expresión constitutivos de AHR a nivel celular.

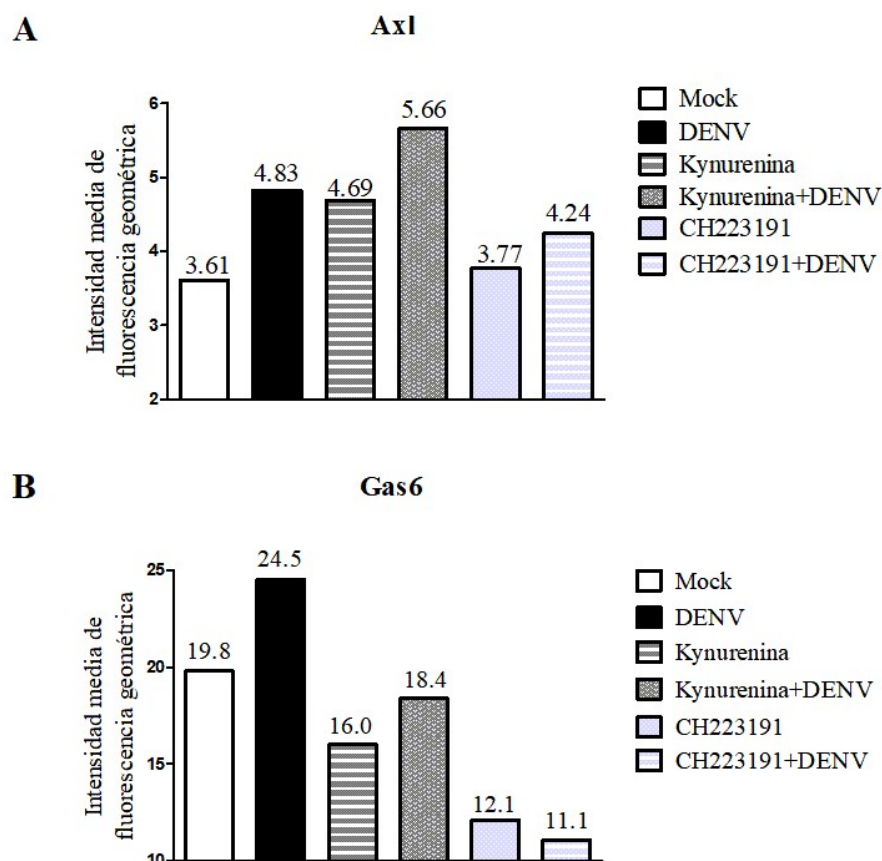


Figura 49. AHR impacta en los niveles proteicos de Axl y Gas6 durante una infección por DENV. Células A549 fueron pre-tratadas con medio, kynurenina o CH223191 y posteriormente infectadas con DENV-2. A las 48hpi se cosecharon muestras para procesarse por FACS. Los gráficos corresponden a los niveles proteicos totales Axl (A) y los niveles proteicos totales Gas6 (B) para cada condición. Los resultados corresponden a los valores de intensidad media de fluorescencia geométrica (IMFg).

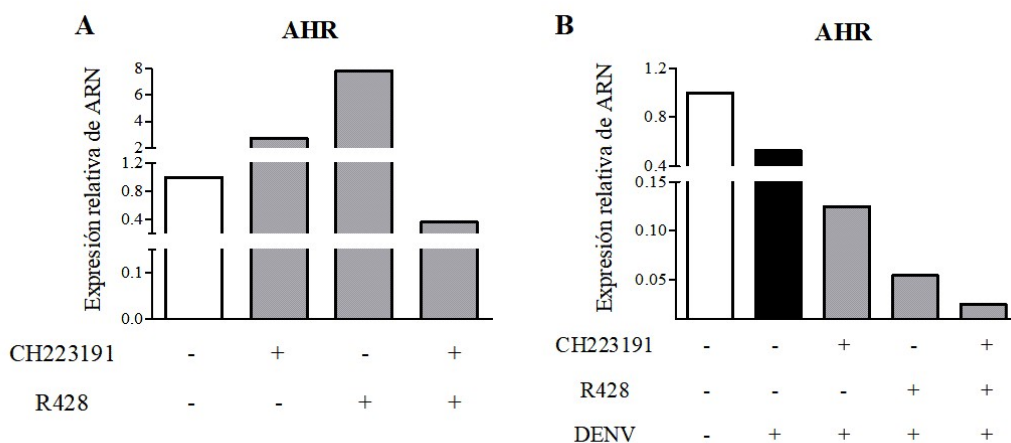


Figura 50. Axl afecta la expresión de AHR. Células A549 fueron pre-tratadas con medio, R428, CH223191 o R428+CH223191. A continuación las células fueron inoculadas con vehículo (A) o infectadas con DENV-2 (B). A las 24hpi se cosecharon muestras para procesarse por RT-qPCR. En todas las muestras se determinaron los niveles de mRNA de AHR. Se graficó el valor medio de la expresión relativa de ARN (veces de cambio).

Curiosamente, se pudo observar que células pre-tratadas con R428 e infectadas con DENV-2, exhiben niveles de expresión de AHR incluso más bajos que los registrados en el caso del tratamiento combinado de CH223191 y DENV-2, DENV-2 y el control (Figura 50B).

Estos resultados aparentemente contradictorios podrían implicar dos cosas: por un lado que el rol de Axl en la regulación de AHR podría depender del estado celular, es decir que podría estar ejerciendo un rol regulatorio negativo en condiciones basales, pero uno regulatorio positivo durante una infección viral por DENV. Por otro lado, lo que podría estar ocurriendo es que en realidad el efecto de disminución tan drástico observado durante la infección, se debe a que en este caso, la inhibición de Axl, afectaría en mayor medida el ciclo viral de DENV, y como DENV es un gran inductor de AHR, al reducir los niveles de infección viral, también se vería disminuida la inducción de la expresión de AHR.

Sorpresivamente, la inhibición conjunta de AHR y Axl, reduce en forma más drástica los niveles de expresión de AHR en el contexto de infección (Figura 50B). Este resultado, apoyaría la hipótesis de que los efectos observados a nivel de la expresión de AHR en el contexto de la infección por DENV, deberían deberse al impacto de las vías de señalización en la replicación viral y subsecuentemente, esta disminución de la replicación viral, impactaría en la inducción de la expresión de AHR. Sin embargo, cabe destacar que la administración combinada de CH223191 y R428 fue capaz de disminuir los niveles del ARNm de AHR incluso en ausencia de infección, lo cual sugeriría una sumatoria de efectos de la inhibición de AHR y Axl, en condiciones basales (Figura 50A).

Estos resultados en conjunto indican que por un lado que Axl es capaz de regular negativamente los niveles de expresión del ARNm de AHR. Posiblemente en condiciones basales, desempeña un rol como regulador de los niveles constitutivos de ARNm de AHR.

Durante la infección por DENV, dado que ambas proteínas impactan en el ciclo viral, los niveles de ARNm de AHR registrados, es probable que sean un reflejo de la inducción por parte de la infección. En caso de existir algún tipo de regulación por parte de Axl, su efecto quedaría enmascarado por el efecto regulatorio más importante llevado a cabo por el virus.

6. El bloqueo farmacológico de AHR y Axl en simultáneo impacta sinérgicamente en los niveles de expresión del genoma de DENV

Ha sido reportada la importancia de Axl como factor pro-viral durante la infección por DENV. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha podido demostrar y describir que AHR es un factor pro-viral importante durante la replicación de DENV *in vitro*. Asimismo, hemos podido demostrar que durante la infección tanto AHR como Axl se encuentran sobre-expresados y hemos podido describir por primera vez la interacción entre las vías de señalización de AHR y de Axl en ausencia y en presencia de la infección por este flavivirus.

El siguiente paso en nuestra investigación fue evaluar si el bloqueo farmacológico de ambas vías de señalización en simultáneo, afecta la replicación viral en forma diferente a la observada al inhibir cada vía por separado, con motivo de estudiar un posible efecto sinérgico de ambas vías de señalización.

Para ello células A549 fueron tratadas con medio, R428, CH223191 o con una combinación de R428 y CH223191 previo a la infección con DENV-2. Al cabo de 24h, las células fueron cosechadas para procesarse por RT-qPCR (Figura 51).

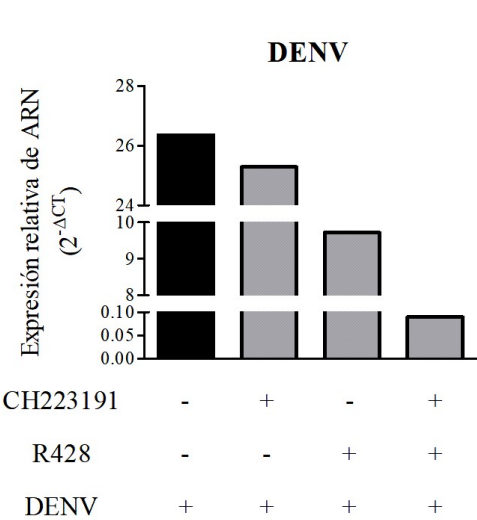


Figura 51. La inhibición conjunta de AHR y Axl reduce los niveles del genoma viral en forma sinérgica. Células A549 fueron pre-tratadas con medio, R428, CH223191 o R428+CH223191. A continuación las células fueron infectadas con DENV-2. A las 24hpi se cosecharon muestras para procesarse por RT-qPCR. En todas las muestras se determinaron los niveles del ARN de DENV. Se graficó el valor medio de la expresión relativa de ARN (2^{-ΔCT}).

Los resultados obtenidos demuestran no sólo que el bloqueo de AHR y el del Axl reducen los niveles de genoma viral, sino, aún más importante, que la inhibición conjunta de AHR y Axl reduce en más de 100 veces los niveles del ARN de DENV con respecto al registrado para CH223191 y R428 por separado, poniendo de manifiesto la sinergia entre ambas vías (Figura 51).

Estos resultados sugieren que DENV al activar AHR y Axl, maximizaría sus estrategias para facilitar su replicación a nivel celular, ya que el bloqueo de ambas previo a la infección, logra reducir drásticamente los niveles de ARN viral (Figura 51).

7. AHR y Axl afectan los niveles de expresión de PML en presencia y en ausencia de una infección por DENV

Con motivo de indagar en los posibles mecanismos involucrados en la sinergia de AHR y Axl durante una infección por DENV, y considerando que ya ha sido reportado que AHR sería capaz de interferir con la expresión de *pml* al limitar la activación de NFκB en una infección por ZIKV [99], decidimos evaluar el impacto de ambas vías de señalización por separado y en conjunto en la expresión de PML durante la infección por DENV.

Teniendo en cuenta que AHR y Axl son capaces de suprimir a NFkB [161] y dado que la expresión de PML es regulada positivamente por NFkB [99], entonces nos propusimos estudiar los efectos de la inhibición de AHR y Axl sobre los niveles de expresión de PML (Figura 52).

Para ello células A549 fueron tratadas con medio, R428, CH223191 o con una combinación de R428 y CH223191 previo a la inoculación de medio (Figura 52A) o a la infección con DENV-2 (Figura 52B). Las muestras fueron cosechadas 24hpi para procesarse por RT-qPCR (Figura 52). Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar que la inhibición conjunta de AHR y Axl durante una infección por DENV, aumenta en forma sinérgica los niveles de expresión de PML (Figura 52B). Se pudo observar que durante una infección por DENV, si bien, R428 es capaz de promover un incremento de PML respecto del mock y de DENV, cuando se co-administran CH223191 y R428 se observa un aumento aún mayor al registrado en todas las otras condiciones experimentales ensayadas (Figura 52B). Estos resultados sugieren que AHR y Axl, presentan sinergia en términos de la regulación de *pml* en el contexto de infección por DENV.

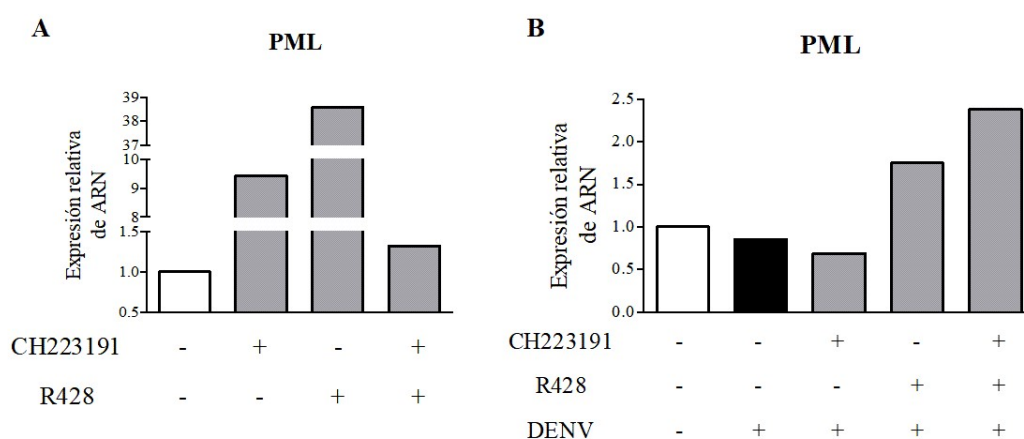


Figura 52. Análisis del impacto del bloqueo de AHR y Axl en la expresión de PML en presencia y en ausencia de infección por DENV. Células A549 fueron pre-tratadas con medio, R428, CH223191 o una combinación de R428 y CH223191. A continuación las células fueron inoculadas con medio (A) o infectadas con DENV-2 (B). A las 24hpi se cosecharon muestras para procesarse por RT-qPCR. En todas las muestras se determinaron los niveles del ARN de PML con primers pan-PML. Se graficó el valor medio de la expresión relativa de ARN (veces de cambio).

Por otro lado, en ausencia de infección se pudo observar que tanto la inhibición de AHR como la de Axl, aumentan los niveles de expresión de PML, demostrando que ambas vías regulan en forma negativa los niveles de expresión de PML (Figura 52A). Notoriamente, la administración conjunta de las drogas inhibitorias, no presentó sinergia en términos de los niveles de expresión de PML, de hecho, los niveles de ARNm registrados si bien fueron superiores a los de la condición mock, fueron significativamente menores respecto de las condiciones de CH223191 y R428 (Figura 52A). Lo cual podría implicar que ambas

regulaciones negativas, parecerían presentar sinergia a nivel de la regulación de la expresión de PML durante la infección por DENV. Sin embargo, este fenómeno no se observa en ausencia de infección, de hecho, los resultados parecen indicar que la contribución del bloqueo de AHR y Axl sobre la expresión de *pml*, se anularan entre sí.

En este contexto, debemos considerar que existen otros factores que regulan la expresión de *pml* que no estamos considerando, junto con el hecho de que PML también es una proteína con funciones importantes a nivel celular. Por ejemplo, PML se encuentra involucrada en múltiples vías asociadas al mantenimiento del genoma, e incluso en la apoptosis asociada a p53, entre otros[169]. Por lo tanto, es razonable pensar que aunque haya estímulos que provoquen un aumento aún mayor del transcripto de *pml*, en la célula van a preponderar mecanismos que contrarresten ese incremento para mantener la homeostasis. Durante una infección, ese aumento de PML provocado por el bloqueo concomitante de AHR y Axl, sería beneficioso para la célula ya que permitiría restringir la infección.

En conclusión, los resultados obtenidos indican no sólo que AHR y Axl son capaces de regular en forma negativa la expresión de una proteína con funciones antivirales como lo es PML, en presencia como en ausencia de infección (Figura 52). Aún más importante, la inhibición conjunta de ambas vías durante una infección por el virus, induce un aumento significativo en los niveles de expresión del ARN de PML, implicando que las mismas presentarían un efecto sinérgico a nivel de la regulación de PML durante la infección, pero no en condiciones basales.

Durante el desarrollo de los experimentos descritos en este capítulo, se pudo establecer una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Eugenio Antonio Carrera-Silva del Instituto de Medicina Experimental (IMEX) de la Academia Nacional de Medicina (ANM), que se especializa en el estudio de receptores de tipo TAM. En particular durante dicha colaboración surgió la posibilidad de realizar ensayos en monocitos aislados de donantes humanos sanos, debido a que el Dr. Carrera Silva trabaja en forma diaria con muestras provenientes del Banco de Sangre.

Los monocitos constituyen células blanco cruciales durante la infección por DENV, de hecho, se considera que los mismos se encuentran involucrados en varias etapas del proceso de infección y en particular, son actores clave en el proceso de distribución del virus a distintos tejidos durante la infección.

Por este motivo, decidimos estudiar si este bucle regulatorio entre AHR y Axl, también se daba en infección de monocitos *ex vivo* y así poder evaluar su relevancia en un modelo celular relevante durante la infección por DENV *in vivo*.

8. DENV modifica la expresión de Axl y Gas6 a 24h y 48h en forma diferencial en monocitos humanos en ensayos in vitro

Con motivo de estudiar el impacto de DENV en los niveles de expresión de Axl en monocitos humanos, se procedió a sembrar microplacas de 96 pocillos con células CD14⁺ humanas, aisladas y purificadas a partir de células mieloides de sangre periférica (PBMCs) de un donante sano. Al cabo de 16-24h de adhesión, se realizó la infección de los monocitos con una (MOI~0,5), realizando la adsorción viral durante 2h para maximizar la interacción de las células con el inóculo viral y así promover una mayor infección. A las 24hpi, se procedió a cosechar muestras para análisis por FACS (Figura 53). En este caso, se decidió realizar la marcación de Axl en forma total (Figura 53A) y asimismo se llevó a cabo la tinción de HLA-DR, CD80 y CD40 como marcadores de activación de los monocitos (Figura 53 B-D).

En principio se puede observar que DENV aumenta la expresión de Axl a 24h de la infección, en un cultivo primario de monocitos humanos CD14⁺ aislados a partir de células mieloides de sangre periférica (PBMCs) de un donante sano. (Figura 53A). Asimismo, se pudo observar que durante la infección los monocitos presentaron un aumento de la expresión de los marcadores de activación HLA-DR, CD80 y CD40 (Figura 53 B-D).

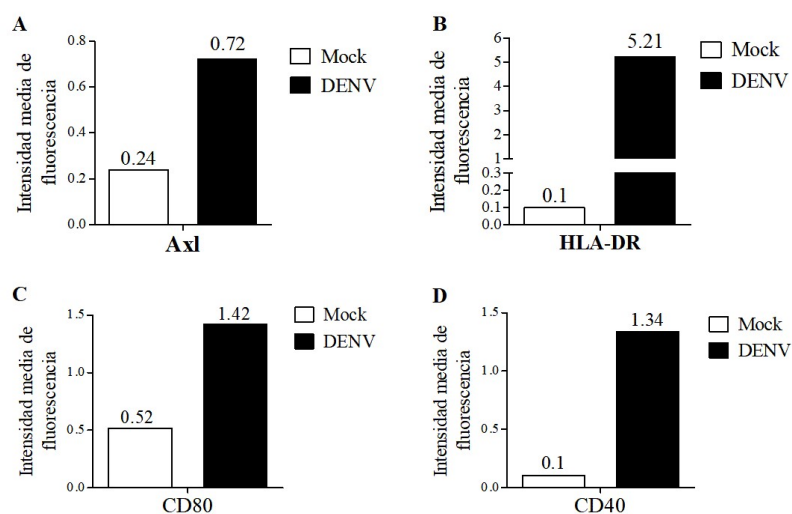


Figura 53. DENV induce la expresión de Axl y la activación de monocitos humanos a 24hpi. Cultivo primario de monocitos humanos CD14⁺ aislados a partir de células mieloides de sangre periférica (PBMCs) de un donante sano fueron infectados con DENV-2 por 24h. A continuación, se procedió a cosechar las muestras para procesarse por FACS. Se realizó la marca de Axl total (A), HLA-DR (B), CD80(C) y CD40 (D). Se graficó la intensidad de fluorescencia media para cada proteína.

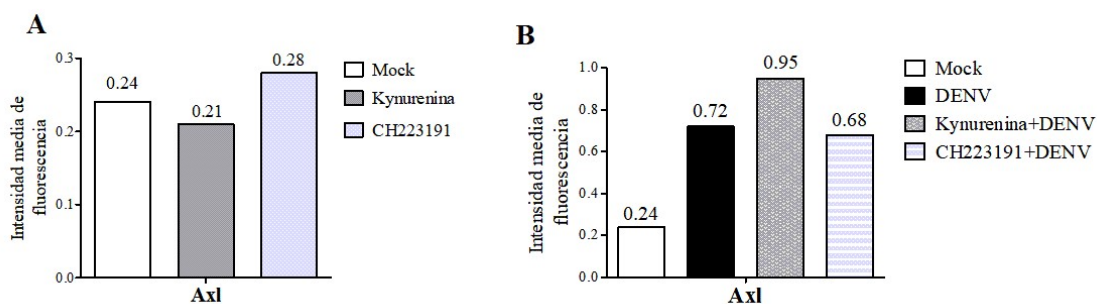


Figura 54. La modulación de AHR durante una infección por DENV de monocitos humanos modifica el nivel de Axl a 24hpi. Cultivo primario de monocitos humanos CD14+ aislados a partir de células mieloides de sangre periférica (PBMCs) de un donante sano fueron tratados con kynurenina o CH223191 y posteriormente inoculados con medio (A) o infectados con DENV-2(B) por 24h. A continuación, se procedió a cosechar las muestras para procesarse por FACS. Se realizó la marca de Axl total para todas las muestras. Se graficó la intensidad de fluorescencia media.

En un siguiente paso, quisimos estudiar si la modulación de AHR era capaz de impactar en los niveles de expresión de Axl en un cultivo de monocitos primarios humanos en presencia o en ausencia de infección por DENV a 24hpi (Figura 54).

En primer lugar se pudo observar que durante una infección por DENV, los niveles registrados de Axl fueron significativamente mayores respecto del control mock (Figura 54 B). Es importante destacar que el aumento de Axl durante la infección parecería ocurrir independientemente de la administración de moduladores de AHR, al menos a las 24hpi (Figura 54B). Se puede observar que en células tratadas con kynurenina e infectadas con DENV (kynurenina+DENV) y células tratadas con CH223191 e infectadas con DENV (CH223191+DENV), los niveles de Axl son más elevados respecto de las condiciones mock, kynurenina y CH223191, respectivamente (Figura 54A-B). Por otro lado, los niveles de Axl registrados en la condición de kynurenina+DENV son superiores a los determinados en la condición de DENV (Figura 54B). Estos resultados, sugieren que la exposición a agonistas de AHR previo a la infección por este virus, promovería un aumento mayor en la expresión de Axl (Figura 54B). Es importante destacar, que este fenómeno ya había sido registrado en ensayos realizados con el modelo de A549, descrito anteriormente en este capítulo.

En el caso de las células tratadas con CH223191 y posteriormente infectadas con DENV, se pudo observar que las mismas exhibían niveles ligeramente menores de Axl respecto de mock y significativamente más bajos que los medidos en la condición de kynurenina + DENV (Figura 54B).

Estos resultados en conjunto sugieren que por un lado, DENV es capaz de inducir la expresión de Axl en monocitos humanos infectados a 24hpi. Si bien, la modulación de AHR no produce cambios tan drásticos, los cambios observados en los niveles de expresión de Axl en el contexto de infección podrían ser producto de distintos escenarios que no son excluyentes entre sí: por un lado DENV podría regular la expresión de Axl en monocitos en

forma dependiente de AHR, al menos parcialmente pero este no sería el único mecanismo que promovería el aumento de la expresión proteica de Axl en este sistema celular. Por otro lado, podría ocurrir que en realidad, la variación observada en los distintos tratamientos, fuera producto del impacto de los moduladores de AHR en los niveles de infección y que eso, fuera lo que en una segunda instancia terminara aumentando en mayor o en menor medida los niveles de expresión de Axl.

Con motivo de evaluar la potencial interacción entre ambas vías de señalización durante una infección por DENV en un cultivo primario de monocitos humanos, se procedió a pre-tratar células CD14+ con medio, CH223191, R428 o CH223191 previo a la inoculación con vehículo o la infección con DENV-2 (Figura 55-56). A 48hpi, se procedió a realizar la cosecha de células para procesar por FACS. En esta oportunidad se decidió recolectar las células a las 48hpi, debido a que en el ensayo previo se había observado que la infección por DENV constituía el mayor inductor de la expresión de Axl, a 24hpi, entonces, hipotetizamos que a 48hpi quizás podrían observarse diferencias aún mayores entre los tratamientos. Se realizó la marca de Axl total o Gas6 total.

Sorprendentemente, en las células infectadas con DENV fue registrada una reducción de los niveles de expresión de Axl y Gas6 a las 48hpi (Figura 55 A-B). Contrariamente a lo que esperamos, 24h más tarde, se observa una disminución de dichas moléculas. Estos resultados, podrían explicarse por una sumatoria de factores: por un lado, podría observarse una disminución en la expresión de las proteínas debido a mecanismos de compensación de la célula para regresar a un estado de homeostasis. Por otro lado, dado que Axl es un inhibidor potente de la respuesta inmune y que las células son justamente monocitos, es muy probable que con motivo de controlar la infección por el virus, se gatillen mecanismos internos celulares que permiten restringir la actividad de represores, entre ellos Axl.

Los resultados obtenidos en conjunto indican que DENV es capaz de promover un aumento de la expresión de Axl en monocitos humanos a 24hpi, sin embargo, a 48hpi el efecto observado es el contrario, posiblemente por mecanismos celulares asociados a un intento de control de la infección viral.

La evaluación del efecto de inhibidores de AHR y Axl, a nivel de la expresión de Axl y Gas6 en cultivos primarios de monocitos humanos, puso de manifiesto que el tratamiento por 48h reduce significativamente la expresión de ambas proteínas respecto del mock. Ahora bien, cuando se inhibieron AHR, Axl o se bloquearon AHR y Axl en forma concomitante (AHR + Axl), durante la infección por DENV, se pudo observar no sólo una reducción significativa de la expresión de Axl y Gas6 respecto del mock, sino también una tendencia a presentar valores más bajos respecto de las condiciones de inhibición de AHR, Axl y la condición de AHR+Axl sin infección (Figura 56A-B).

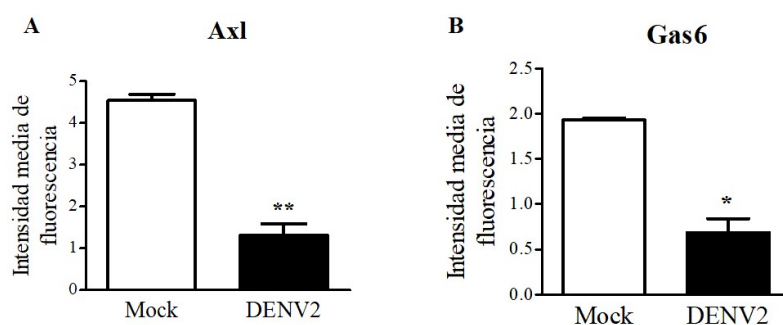


Figura 55. Expresión de Axl y Gas6 en monocitos infectados con DENV por 48h. Cultivo primario de monocitos humanos CD14+ aislados a partir de células mieloides de sangre periférica (PBMCs) de dos donantes sanos fueron infectados con DENV-2 por 48h. A continuación, se procedió a cosechar las muestras para procesarse por FACS. Se realizó la marca de Axl total (A) o Gas6 total (B). Se graficó la intensidad de fluorescencia media $\pm$ SEM para cada proteína. El análisis estadístico se llevó a cabo por T-test no apareado de dos colas con un intervalo de confianza del 95%. Se consideró significativo $p < 0.05$.

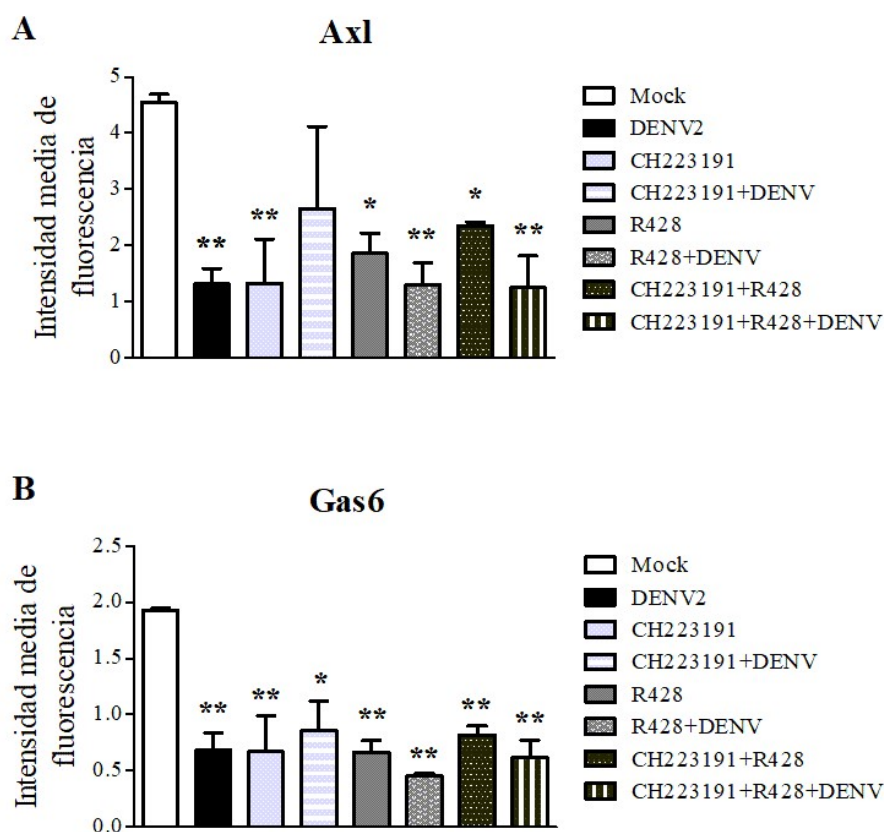


Figura 56. Impacto de la modulación farmacológica de AHR y Axl en la expresión de Axl y Gas6 en monocitos infectados con DENV por 48h. Cultivo primario de monocitos humanos CD14+ aislados a partir de células mieloides de sangre periférica (PBMCs) de dos donantes sanos fueron tratados con medio, CH223191, R428 o una combinación de las drogas previo a la infección con DENV-2 por 48h. A continuación, se procedió a cosechar las muestras para procesarse por FACS. Se realizó la marca de Axl total (A) o Gas6 total (B). Se graficó la intensidad de fluorescencia media $\pm$ SEM para cada proteína. El análisis estadístico se llevó a cabo por one-way ANOVA seguido por Dunnet's post test. Se consideró significativo $p < 0.05$.

Capítulo III

MODELO PARCIAL

MODELO PARCIAL DEL CAPÍTULO III.

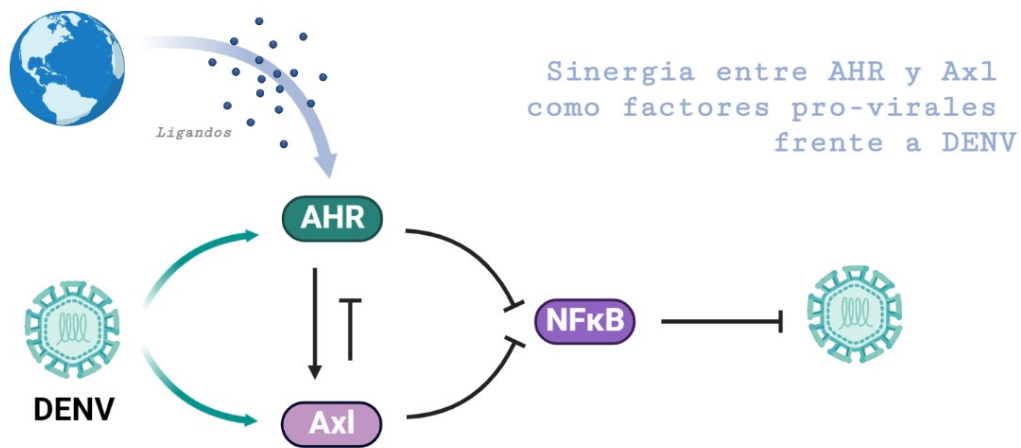


Figura 57. AHR y Axl: interacción entre factores pro-virales durante una infección por DENV. El virus DENV induce la activación y la expresión de AHR y de Axl durante la infección. Luego de su activación, AHR es capaz de promover la expresión de Axl, mientras que Axl sería capaz de suprimir parcialmente los niveles de expresión de AHR. AHR y Axl son capaces de suprimir a NFκB y con ello los mecanismos antivirales celulares capaces de combatir al virus. Los efectos inhibitorios de AHR y Axl a nivel de NFκB presentarían sinergia. La exposición a moléculas agonistas de AHR permiten que este ciclo se vea incrementado aún, al promover la activación de AHR.

Discusión

DISCUSIÓN

En la actualidad, cada día contamos con una mayor cantidad de evidencia que indica que el medioambiente y nuestra interacción con el mismo, son capaces de moldear nuestra susceptibilidad a contraer enfermedades y el desarrollo de las mismas, pudiendo impactar en su grado de severidad y desenlace final [170,171].

En particular, DENV es capaz de provocar un gran espectro de cuadros clínicos, que varía desde infecciones asintomáticas hasta cuadros de dengue severo que presentan alta tasa de mortalidad. Se ha descrito que la infección consecutiva, por serotipos distintos de DENV es capaz de propiciar el desarrollo de cuadros de severidad incrementada y que esto se debe a la existencia del fenómeno de ADE. Sin embargo, el ADE no logra explicar la totalidad de los cuadros clínicos de mayor severidad, ni la existencia de una amplia variedad de sintomatologías [25]. Lo cual, sugiere que el cuadro clínico resultante por la infección por DENV en un individuo en particular, es producto de la interacción de múltiples factores que en la actualidad no hemos podido identificar.

En este contexto, resulta factible considerar que el medioambiente en el que nos desarrollamos, las actividades y el estilo de vida que llevamos, la dieta que seguimos e incluso los contaminantes a los que estamos expuestos, el denominado *exposoma*, pueden presentar un rol fundamental en el desarrollo de una patología [170,171].

AHR es un sensor medioambiental por excelencia, que presenta un rol crucial en la interfaz entre el individuo y el medioambiente. El descubrimiento del rol clave de AHR como modulador de la respuesta inmune, fue la piedra fundamental que sentó precedente para el surgimiento de un nuevo paradigma en el estudio del comportamiento de la respuesta inmune en distintos escenarios: patológicos y no patológicos; el estudio de AHR en cancer, enfermedades autoinmunes e infecciones se ha vuelto cada vez más y más considerable [35,172].

La investigación del impacto de AHR en las infecciones virales, es un campo de estudio que ha revolucionado la virología en los últimos 20 años. Cada día, se obtiene más evidencia que destaca y revela el rol protagónico de AHR en diversos tipos de infecciones virales [87].

El estudio del rol de AHR en el contexto de la infección por el virus de la influenza A (IAV) ha sido, sin lugar a dudas, el más abordado y en el que más se ha avanzado en las últimas dos décadas. Se ha reportado que AHR se encuentra involucrado en la modulación de las respuestas inmune innata y adaptativa frente a este virus. Incluso, se ha podido develar que la exposición prenatal a compuestos activadores de AHR, eventualmente terminan

modificando el comportamiento de la respuesta inmune antiviral en el período postnatal [89,90,93,94,98,120–124].

En lo referido al los herpesvirus humanos, la mayoría de los estudios sugieren que AHR presentaría un rol pro-viral en las mismas por estar implicado en el cambio de un estado latente a un ciclo lítico en infecciones por virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), citomegalovirus humano (CMV), virus de Epstein Barr (EBV) y virus asociado al Sarcoma de Kaposi (KHSV) o virus herpes humano tipo 8 (HHV-8) [88,92,101,102,173]. En lo referido a la posibilidad de modular AHR como un enfoque terapéutico frente a una patología herpética, la conducta terapéutica podría depender, *a priori*, del desarrollo de la patología y la gravedad de la enfermedad. Por un lado, en los estados agudos de una infección herpética podría ser deseable mejorar el cuadro clínico mediante el bloqueo del AHR y facilitar el paso a un estado latente del ciclo, con el fin de disminuir los signos y síntomas de la patología. Sin embargo, sería razonable sugerir que la activación del AHR podría ser útil en un paso inicial en una terapia combinada, en los casos en los que la terapia antiviral disponible contra una infección herpética no es eficaz porque el fármaco no es capaz de llegar al virus debido a la latencia.

Asimismo, existe una controversia sobre el posible papel del AHR durante las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-1). Actualmente hay cuatro publicaciones que abarcan el impacto de la activación del AHR en la infección por HIV-1, mientras que la mayoría de ellas sugieren que AHR podría tener un papel pro-viral durante las infecciones por HIV-1 [95,97,104], otro estudio sostiene que AHR presenta un papel antiviral durante la infección por HIV-1 de macrófagos derivados de PBMCs humanas [113].

Si bien, el estudio del rol de AHR durante las infecciones virales es un campo incipiente y en algunos casos, presenta resultados controversiales, en la mayoría de los trabajos publicados se ha descrito que AHR presenta un rol pro-viral durante las infecciones virales (*Ver tabla 2 de la sección introducción*).

En este contexto y visto y considerando que en nuestro grupo se ha podido describir la importancia de AHR durante una infección por el flavivirus Zika (*Ver sección introducción*), el objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar la vía de señalización de AHR como posible estrategia antiviral frente a una infección por DENV.

El objetivo del primer capítulo de esta tesis fue estudiar la vía de señalización de AHR en el contexto de una infección por DENV, para lo cual decidimos emplear el serotipo DENV-2, ya que el mismo es considerado el prototipo de DENV.

Los resultados obtenidos nos permitieron evidenciar que DENV-2 activa la vía de señalización de AHR a 24hpi. Adicionalmente, evaluamos el impacto de la infección por

DENV-2 en los niveles de expresión de AHR mediante IFI. Los resultados obtenidos nos permitieron describir que efectivamente, la infección por este virus no sólo activa la vía de AHR, sino que además induce la expresión de esta proteína a 24hpi. Asimismo, promueve su translocación del citoplasma al núcleo en etapas tempranas de la infección.

Con motivo de dilucidar los posibles mecanismos que promueven la activación de AHR durante una infección por DENV, se llevaron a cabo ensayos con ARN sintético, un conocido agonista de TLR3. Los resultados nos permitieron evidenciar que AHR se induce luego de la administración de poly I:C por 24h. De hecho, se observó que incluso, luego de 12h de tratamiento, es detectable un aumento de la expresión de AHR y de algunos de sus genes blanco canónicos, indicando que la vía se encuentra activa. Estos estudios sugieren que el genoma de ARN de DENV podría ser capaz de gatillar la misma cascada de señalización y nos permite proponer que al menos una de las vías mediante las cuales AHR puede ser activado durante la infección por DENV es a través de la activación de TLR3.

El siguiente paso consistió en evaluar el posible rol de AHR durante la infección. Para ello, cultivos celulares fueron tratados con drogas moduladoras de la actividad de AHR previo a la inoculación del virus, y a las 24hpi se evaluó el impacto en la infección a distintos niveles: cantidad del genoma viral y proteína viral, porcentaje de células infectadas y producción de partículas virales infectivas.

El bloqueo farmacológico de AHR previo a una infección con DENV-2, disminuyó los niveles de ARN viral cuantificados por RT-qPCR a 24hpi. Adicionalmente, la inhibición de AHR, redujo el porcentaje de células infectadas por DENV-2 en forma significativa y dosis dependiente. Aún más importante, la administración de antagonistas de AHR previo a la infección con DENV-2, inhibió en forma significativa la producción de partículas virales infectivas, siendo este efecto dependiente de la dosis y desde la concentración más baja testada.

Los resultados previamente mencionados, evidencian por primera vez que la vía de señalización de AHR es sumamente relevante durante el proceso de replicación viral de DENV-2.

Estudios adicionales realizados con DENV-1, DENV-3 y DENV-4, nos permitieron demostrar que AHR es un factor pro-viral importante para todos los serotipos de DENV. La inhibición farmacológica de AHR previo a una infección por DENV-1, DENV-3 ó DENV-4, provocó una disminución del título viral de todos los serotipos en forma dosis dependiente.

Cuando se procedió a activar la vía de AHR previo a la infección por DENV, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células infectadas por DENV, ni en el rendimiento viral. Estos resultados podrían ser producto de tres posibles escenarios:

- (1) El virus ya se encuentra replicando con su máxima eficiencia en estos cultivos celulares. En consecuencia, con la MOI utilizada, al agregar agonistas de AHR, no se logran observar aumentos significativos en los rendimientos virales.
- (2) El tratamiento conjunto de un agonista de AHR y la infección por DENV, promueve una exacerbación de la activación de AHR de una magnitud tal que, consecuentemente, provoca una supresión de AHR producto de su mecanismo de auto-regulación negativo liderado por su represor: AHRR.
- (3) Las concentraciones empleadas de agonista, si bien son capaces de activar la vía, no promueven un aumento en la replicación viral detectable por las técnicas empleadas.

Cabe destacar que aunque no pudieron registrarse diferencias significativas en el porcentaje de células infectadas respecto del control, se pudo visualizar que la administración del agonista parecería promover un aumento en la intensidad de fluorescencia de la marca de proteína viral, lo cual sugiere un aumento en el contenido de proteína viral en estos tratamientos.

En su conjunto, los resultados obtenidos nos permitieron demostrar que AHR es una vía de señalización relevante durante la infección por DENV y nos permitió proponer a AHR como un factor pro-viral importante, con un gran potencial para ser utilizado como blanco terapéutico celular frente una infección por este flavivirus. Nuestro próximo objetivo consistió en intentar dilucidar los posibles mecanismos involucrados en el efecto pro-viral de AHR durante la infección por DENV. En principio, podría deberse a dos posibles escenarios no excluyentes entre sí:

- (1) Activación de AHR como mecanismo de evasión al sistema inmune. AHR es un factor de transcripción activado por ligando capaz de modular el sistema inmune a varios niveles. Uno de los posibles mecanismos a través de los cuales podría favorecer la replicación viral es la supresión de la respuesta inmune frente al virus. El estudio de esta hipótesis fue abordado en el capítulo II de esta tesis doctoral.
- (2) Activación de AHR impacta en la expresión de moléculas asociadas a la entrada viral. AHR es un factor de transcripción capaz de regular la expresión de una gran variedad de genes, por lo cual podría ser factible que si AHR regulara la expresión de proteínas asociadas al proceso de entrada viral, esto permitiera un aumento de la infección. El estudio de fue hipótesis será abordado en el capítulo III de esta tesis doctoral.

En el capítulo II, abordamos el estudio de la posible interacción entre AHR y PML, una proteína extensamente estudiada en el campo de la virología por presentar funciones antivirales frente a una amplia variedad de virus. En particular, en nuestro laboratorio, ha sido estudiada y descrita la función antiviral de PML frente a DENV.

Los resultados obtenidos, analizados y descritos en el capítulo II, indican que AHR y PML serían capaces de interactuar durante una infección por DENV, y de hecho, dado que ambas proteínas, cumplen roles antagónicos, es posible que se contrapongan entre sí durante la infección. Por un lado, AHR podría estar participando en el desmantelamiento de los PML-NBs, desarticulando así la función antiviral de estos ensamblados moleculares. Por otro lado, PML podría estar secuestrando a AHR para restringir su actividad a nivel nuclear e impedir que suprima la respuesta inmune y que con ello el virus replique con mayor facilidad.

Nuestro estudio comenzó partiendo de la base de que ambas proteínas presentan comportamientos opuestos en términos de sus niveles de expresión durante la infección. En el capítulo I hemos podido demostrar que durante una infección por DENV, los niveles de expresión de AHR aumentan a 24hpi. En lo que respecta a PML, ya ha sido reportado que por su parte, tanto PML como los PML-NBs, sufren una disminución durante la infección y de hecho, la ARN polimerasa viral (NS5), media la disrupción de dichos ensamblados moleculares al interactuar con PML[148,149].

El siguiente paso consistió en la evaluación de la potencial interacción entre AHR y PML en células no infectadas. Hemos podido observar que ambas proteínas parecerían no interactuar entre sí en ausencia de infección. Células con mayores niveles de AHR a nivel nuclear, presentan un menor número y tamaño de PML-NBs. Por el contrario, células que contienen una menor cantidad de AHR a nivel nuclear, exhiben un mayor número de PML-NBs.

Estos primeros resultados, nos permitieron notar que parecería haber una correlación inversa entre los niveles de AHR y de PML a nivel nuclear. Con motivo de estudiar si este fenómeno también podría tener lugar durante una infección, en principio optamos por comenzar por ensayos en los que cultivos celulares fueran tratados con poly I:C, un análogo de ARN que permite emular las infecciones virales en forma más simplificada, permitiendo analizar el posible efecto del genoma viral durante la infección.

En particular, se pudo observar que poly I:C no sólo es capaz de afectar la expresión de AHR y PML en forma diferencial, los efectos registrados eran dependientes del tiempo. Los resultados obtenidos parecen indicar que AHR y PML se excluyen mutuamente a nivel nuclear, fenómeno descrito con anterioridad. Células con mayores niveles de AHR a nivel nuclear, presentaron un menor número y/o menor tamaño de PML-NBs, mientras que al

disminuir los niveles de AHR a nivel nuclear, se registró un mayor número y/o mayor tamaño de los PML-NBs.

El tratamiento con poly I:C desencadenó cambios en la expresión y localización de AHR y PML, de forma diferencial y dependiente del tiempo. Esto sugiere que AHR y PML podrían estar regulados de forma opuesta dentro del núcleo. Resulta interesante destacar que estas diferencias observadas a lo largo del tiempo, evidencian el dinamismo de la interacción entre estas proteínas.

Los ensayos de co-transfección con plásmidos codificantes para AHR y PML, permitieron poner de manifiesto por primera vez que AHR y PML, podrían interactuar entre sí. La co-localización entre ambas proteínas sugiere una posible interacción física entre las mismas. Adicionalmente, pudimos describir que AHR es capaz de co-localizar con ciertas isoformas de PML pero con otras no, lo cual implicaría que AHR presentaría interacciones isoforma específica con PML. Este hallazgo, resulta particularmente interesante por varios motivos. Por un lado, las isoformas de PML se encuentran en distinta proporción a nivel nuclear y se les ha atribuido distintas funciones o actividades a las mismas. Por lo que la interacción entre AHR y ciertas isoformas de PML, podría afectar en forma definida ciertos tipos de funciones o procesos a nivel celular. Es importante destacar que, ya había sido descrito que NS5 de DENV es capaz de interactuar con las isoformas III y IV de PML, que previamente habían sido descritas como isoformas con propiedad antiviral. Este fenómeno refuerza la idea de que sería posible que DENV al activar a AHR, lograría afectar en forma isoforma específica a PML.

Por otro lado, hemos podido poner de manifiesto que la localización nuclear de NS5 varía de acuerdo a los niveles celulares de PML. Ensayos llevados a cabo en células co-transfectadas con plásmidos codificantes para PML y NS5 de DENV-2, permitieron demostrar que NS5 es capaz de localizarse en los PML-NBs tanto como en el nucleolo celular. Esta localización nuclear, dependería de los niveles de PML ya que, a mayores niveles de expresión de esta proteína, estos ensamblados moleculares secuestrarían a NS5 de los nucleolos celulares. Estos hallazgos, nos permiten poner en evidencia el dinamismo que podrían presentar las interacciones de PML y NS5 durante una infección por este flavivirus y, nos permiten aportar nueva información en lo que respecta al ciclo de infección viral y a los posibles mecanismos antivirales asociados a PML.

Por lo cual, teniendo en cuenta que hemos podido describir una co-localización entre AHR y PML, junto con el hecho de que ha sido reportado que NS5 es capaz de interactuar con PML, y que pudimos demostrar que esta interacción es extremadamente dinámica, estos hallazgos en conjunto sugieren que podría existir una potencial interacción entre AHR-PML-NS5 que podría ser producto de distintos escenarios, no necesariamente excluyentes entre sí:

- (1) Podría ser que NS5 interactuara con AHR y esta interacción le permitiera promover el desensamble de los PML-NBs como mecanismo de evasión al sistema inmune.
- (2) Podría ser que PML, en realidad, reclutara a AHR como mecanismo antiviral. Dado que de esa forma, podría secuestrarlo en el ambiente nuclear, evitando que AHR sea capaz de regular negativamente el sistema inmune.

En resumen, AHR y PML presentan funciones antagónicas durante la infección por DENV y su interacción podría constituir un nuevo blanco antiviral que debe ser explorado en mayor profundidad.

El objetivo del capítulo III de esta tesis doctoral se centró en el estudio del posible impacto de AHR en la regulación de la expresión de proteínas asociadas al proceso de entrada viral, lo cual podría promover un aumento de la infección.

Axl es una de las proteínas candidatas a receptor de entrada de DENV y, que además, ha sido caracterizada como un factor pro-viral durante la infección [164,165,168]. Sin embargo, hasta el momento, no ha sido reportado si DENV es capaz de impactar en la expresión de dicha proteína ni se encuentran claros los factores que regulan su expresión a nivel celular.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la posible interacción entre AHR y Axl durante una infección por DENV, haciendo hincapié en los mecanismos celulares involucrados en la regulación de la expresión de Axl.

En primer lugar estudiamos los niveles de expresión de Axl durante una infección. Este aspecto no había sido abordado anteriormente y nos pareció interesante analizarlo. Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar que la infección por DENV aumenta la expresión de mRNA de Axl a 24hpi y de proteína a 48hpi en cultivos celulares de A549.

Ha sido reportado que DENV interactúa con Axl en forma indirecta. Ha sido determinado que DENV debe unirse a Gas6 -el ligando de Axl- para ser reconocido por el receptor y poder entrar en la célula en forma dependiente de Gas6-Axl [165]. Por este motivo, resulta interesante destacar que DENV parecería tener un efecto sobre Gas6 semejante al observado sobre Axl: la infección por DENV aumenta los niveles de expresión de Gas6 tanto a nivel del mRNA como a nivel proteico, a 24hpi y 48hpi respectivamente, en cultivos celulares de A549.

Este hallazgo es particularmente relevante, debido a que sigue aportando evidencia sobre la importancia del eje Gas6-Axl durante la infección viral. DENV promueve la expresión de Axl y de la proteína Gas6 que es requerida para auspiciar de puente y permitir la interacción entre el virus y Axl.

Experimentos llevados a cabo en un cultivo primario de monocitos humanos, nos han permitido demostrar que DENV también es capaz de aumentar los niveles de expresión proteicos de Axl a 24hpi. Curiosamente, se encontró que a 48hpi, monocitos humanos infectados por DENV presentan no sólo una disminución de la expresión de Axl, sino además, una reducción en la expresión de Gas6, en comparación con el control. Este fenómeno podría deberse a que Axl es un inhibidor potente de la respuesta inmune. En este contexto, los monocitos no sólo se encontrarán infectados, sino que además intentarán resolver la infección viral, por lo cual es muy posible que mecanismos de regulación internos del fagocito terminen reduciendo los niveles de este supresor de la respuesta inmune justamente para que la célula pueda controlar la infección.

Los resultados obtenidos han permitido demostrar que DENV es capaz de inducir la expresión de Axl y Gas6 en células A549 tanto como en cultivos primarios de monocitos.

Con motivo de investigar los posibles mecanismos involucrados en la sobre-expresión de Axl durante una infección por DENV, decidimos evaluar si AHR era capaz de regular la expresión de Axl.

En primer lugar pudimos comprobar que AHR es capaz de regular la expresión de Axl tanto en presencia como en ausencia de infección. La exposición de cultivos celulares a agonistas de AHR previo a la infección, promovió un aumento aún mayor en los niveles de ARNm de Axl respecto de células infectadas y no tratadas con la droga, a 24hpi. El mismo fenómeno fue registrado a nivel de la expresión proteica de Axl en células tratadas con un agonista de AHR e infectadas con DENV, a 48hpi.

Estos resultados sugieren que la modulación de AHR es capaz de impactar en la regulación de Axl durante la infección y es posible que constituya al menos uno de los mecanismos de regulación empleados por DENV para promover la expresión de Axl. Por el contrario, la administración de un antagonista de AHR previo a la infección con DENV provocó una reducción en los niveles de ARNm de Axl y de Gas6, a 24hpi. En términos de los niveles proteicos de Axl y Gas6, se pudo observar que la administración del antagonista previo a la infección reduce los niveles de expresión de las proteínas respecto de los valores registrados para los tratamientos con agonistas de AHR y respecto del control sin infectar (mock).

Resulta importante destacar que se pudo observar que DENV es capaz de promover la expresión de Axl en mayor o en menor medida, en presencia de los moduladores de AHR. Por lo cual, si bien DENV regula la expresión de Axl y Gas6, es posible que lo haga a través de mecanismos dependientes e independientes de AHR, ya que el estado de activación de este receptor no nos permite explicar totalmente el fenotipo de Axl y Gas6 durante la infección.

Estos mismos fenómenos también pudieron describirse en un cultivo primario de monocitos, lo cual sugiere que este bucle regulatorio entre AHR y Axl durante la infección, posiblemente se encuentre extendido a otros modelos celulares relevantes para la infección.

Experimentos adicionales realizados con ARN sintético, nos permitieron evidenciar que el mismo es capaz de gatillar la expresión de Axl y que este mecanismo sería mediado por AHR. Estos resultados sugieren que durante una infección por DENV, el ARN viral al activar TLR3, subsecuentemente activaría AHR y este último sería responsable, al menos parcialmente, del aumento en la expresión de Axl.

En resumen, los resultados obtenidos nos permitieron evidenciar que DENV es capaz de inducir la expresión de Axl y Gas6 durante la infección. Esta regulación de la expresión de Axl y Gas6 sería, al menos parcialmente, dependiente de AHR. El ARN viral sería responsable en parte de la activación de AHR gatillada durante la infección, y éste, terminaría provocando un aumento en la expresión de Axl y Gas6.

Ahora bien, siendo que tanto AHR como Axl exhiben roles pro-virales importantes durante la infección por este flavivirus, se procedió a evaluar si la contribución de ambas vías podría presentar sinergia a nivel de la replicación de DENV. Los resultados obtenidos nos permitieron evidenciar por un lado, que la inhibición de ambas vías de señalización en simultáneo, reduce en más de 100 veces los niveles de ARN viral registrados respecto de las condiciones observadas con los tratamientos por separado. Este resultado evidencia por primera vez que existiría sinergia entre AHR y Axl a nivel del ciclo viral.

En un esfuerzo por lograr identificar a qué nivel podrían estar sumándose y potenciándose las contribuciones de AHR y Axl a nivel regulatorio para facilitar aún más la replicación viral, se procedió a evaluar el efecto de la inhibición conjunta de ambas vías en los niveles de expresión de PML. Los resultados indican que el bloqueo conjunto de AHR y de Axl durante la infección, aumenta los niveles de ARNm de PML. Este incremento fue mayor que el registrado en las condiciones en que se suprimió AHR y Axl por separado, lo que indica que AHR y Axl presentarían un efecto sinérgico a nivel de la represión de la expresión de PML en el contexto de infección viral.

Finalmente, cabe destacar que sorpresivamente, pudimos describir un novedoso potencial bucle regulatorio de AHR previamente no descrito. Por un lado AHR sería capaz de activar la expresión de Axl pero, por otro lado, Axl es capaz de reducir la expresión del mRNA de AHR, al menos en condiciones de no infección.

El objetivo inicial del capítulo III fue evaluar la potencial regulación de proteínas asociadas a la entrada viral como parte de los mecanismos de acción pro-viral de AHR. Afortunadamente pudimos describir que el impacto de AHR sobre Axl no sólo repercutiría a nivel de la entrada viral, sino que además, la sobre-expresión y activación de la vía de Axl en

conjunto con la de AHR también suprime la respuesta inmune antiviral. Pudimos describir que DENV es capaz de promover la expresión de Axl y de Gas6 y que dicha regulación sería dependiente de AHR, al menos parcialmente. Esta sobre-expresión de proteínas involucradas en la etapa de entrada viral, aumentarían los sitios de posible entrada de DENV a nivel celular y por tanto provocarían un estado de mayor susceptibilidad a la infección por este virus, que terminaría aumentando la infección en ciclos virales subsiguientes. Además, descubrimos que durante la infección por DENV, la activación de AHR y de Axl en simultáneo, presentaría un efecto sinérgico a nivel de la supresión de la respuesta inmune antiviral, en particular, en término de los niveles de expresión de PML. Como se ha mencionado previamente, PML es una proteína antiviral relevante cuya expresión es regulada por el factor de transcripción NFkB [99]. Dado que AHR y Axl son represores de NFkB, es muy posible que su efecto inhibitorio a nivel de PML durante una infección por DENV, sea producto de la transrepresión/supresión de NFkB y con ello promoviendo una reducción de los niveles de expresión de PML.

En conclusión, el objetivo de esta tesis doctoral fue investigar la vía de AHR como un posible blanco terapéutico frente a una infección por DENV. Hemos podido describir que durante una infección, DENV induce la activación de AHR y que el mismo, sería capaz de interactuar con distintos componentes celulares y así impactar en la respuesta inmune innata celular, restringiendo las respuestas de defensa de la célula hospedadora y, consecutivamente facilitando la replicación viral. Los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral, permitieron demostrar por primera vez la importancia de la vía de señalización de AHR durante una infección por DENV, y nos permiten proponerla como un novedoso potencial blanco terapéutico que debe seguir siendo explorado.

Conocer nuestra historia nos permite comprender y pararnos de una manera diferente en el presente. Han transcurrido cientos de años desde la primera descripción de enfermedades asociadas a insectos que tuvieran contacto con agua, hasta el día de la fecha, donde se ha podido identificar a DENV como el agente etiológico de dichas enfermedades, se han desarrollado mecanismos de estudio cada vez más sofisticados y se ha podido comenzar a describir los mecanismos moleculares involucrados en la infección. El marco histórico nos permite entender de una manera más global el extenso trayecto recorrido hasta la actualidad y apreciar todo lo que se ha avanzado en este campo en los últimos años. DENV es el virus transmitido por artrópodos de mayor importancia a nivel mundial, y cada día, cada cada pequeño o gran aporte a este campo, nos acerca un poco más a poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que nos permitan abordar y combatir una problemática ancestral que sigue vigente hasta nuestros días.

Modelo integrador

MODELO INTEGRADOR

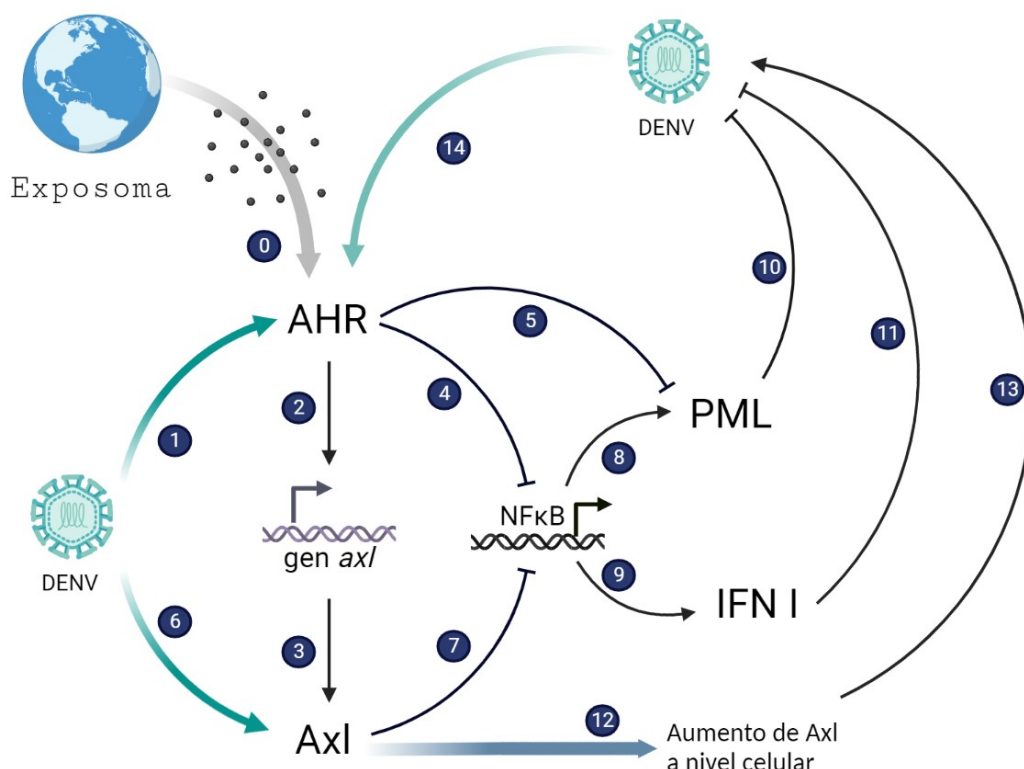


Figura 58. Modelo integrador.

La exposición a ligandos de AHR que forman parte de nuestro exposoma (0) tanto como la infección por DENV (1) son capaces de inducir la activación de AHR. La activación de AHR, desencadena un aumento de la expresión (2) y niveles proteicos (3) de Axl a nivel celular, una transrepresión de NFκB (4) y promueve el desensamblaje de los PML-NBs (5). Por otro lado, la infección por DENV, también aumenta los niveles de Axl (6) y este aumento, lleva a una transrepresión de NFκB (7). La supresión de NFκB por parte de AHR (4) y de Axl (7), termina provocando una disminución de la expresión de PML (8), junto con una reducción de la vía de interferón de tipo I (IFN) (9). Esto, impacta negativamente en la función anti-viral de PML (10) y de IFN I (11). Asimismo, el aumento de Axl a nivel proteico, eventualmente terminaría incrementando esta proteína a nivel de la membrana celular (12) lo cual favorece la entrada viral de DENV (13). La regulación negativa de PML (10), las vías de interferón IFN I (11) y el aumento de un receptor de entrada viral a nivel celular (12,13), termina provocando un aumento en la susceptibilidad a la infección por DENV y promueve un incremento de DENV en ciclos subsiguientes de infección (14).

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Gubler, D.J. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*; 1998; Vol. 11;.
- Gupta, N.; Srivastava, S.; Jain, A.; Chaturvedi, U.C. *Dengue in India*; 2012; Vol. 136;.
- Messina, J.P.; Brady, O.J.; Scott, T.W.; Zou, C.; Pigott, D.M.; Duda, K.A.; Bhatt, S.; Katzelnick, L.; Howes, R.E.; Battle, K.E.; et al. Global Spread of Dengue Virus Types: Mapping the 70 Year History. *Trends Microbiol.* 2014, 22, 138–146.
- Holmes, E.C.; Twiddy, S.S. The Origin, Emergence and Evolutionary Genetics of Dengue Virus. *Infect. Genet. Evol.* 2003, 3, 19–28.
- Guzman, M.G.; Harris, E. Dengue. In *Proceedings of the The Lancet*; Lancet Publishing Group, January 31 2015; Vol. 385, pp. 453–465.
- Shepard, D.S.; Undurraga, E.A.; Betancourt-Cravioto, M.; Guzmán, M.G.; Halstead, S.B.; Harris, E.; Mudin, R.N.; Murray, K.O.; Tapia-Conyer, R.; Gubler, D.J. Approaches to Refining Estimates of Global Burden and Economics of Dengue. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, doi:10.1371/journal.pntd.0003306.
- Ramos-Castañeda, J.; Barreto dos Santos, F.; Martínez-Vega, R.; Galvão de Araujo, J.M.; Joint, G.; Sarti, E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, 11, doi:10.1371/journal.pntd.0005224.
- Tittarelli, E.; Lusso, S.B.; Goya, S.; Rojo, G.L.; Natale, M.L.; Viegas, M.; Mistchenko, A.S.; Valinotto, L.E. Dengue Virus 1 Outbreak in Buenos Aires, Argentina, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23, 1684–1685, doi:10.3201/eid2310.161718.
- Messina, J.P.; Brady, O.J.; Golding, N.; Kraemer, M.U.G.; Wint, G.R.W.; Ray, S.E.; Pigott, D.M.; Shearer, F.M.; Johnson, K.; Earl, L.; et al. The Current and Future Global Distribution and Population at Risk of Dengue. *Nat. Microbiol.* 2019, 4, 1508–1515, doi:10.1038/s41564-019-0476-8.
- Simmonds, P.; Becher, P.; Bukh, J.; Gould, E.A.; Meyers, G.; Monath, T.; Muerhoff, S.; Pletnev, A.; Rico-Hesse, R.; Smith, D.B.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 2017, 98, 2–3, doi:10.1099/jgv.0.000672.
- Murugesan, A.; Manoharan, M. Dengue Virus. In *Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Volume 1: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens*; Elsevier, 2019; pp. 281–359 ISBN 9780128194003.
- Weidman, M.K.; Sharma, R.; Raychaudhuri, S.; Kundu, P.; Tsai, W.; Dasgupta, A. The Interaction of Cytoplasmic RNA Viruses with the Nucleus. *Virus Res.* 2003, 95, 75–85, doi:10.1016/s0168-1702(03)00164-3.
- Caly, L.; Ghildyal, R.; Jans, D.A. Respiratory Virus Modulation of Host Nucleocytoplasmic Transport; Target for Therapeutic Intervention? *Front. Microbiol.* 2015, 6, 848, doi:10.3389/fmicb.2015.00848.
- Audsley, M.D.; Jans, D.A.; Moseley, G.W. Roles of Nuclear Trafficking in Infection by Cytoplasmic Negative-Strand RNA Viruses: Paramyxoviruses and Beyond. *J. Gen. Virol.* 2016, 97, 2463–2481, doi:10.1099/jgv.0.000575.
- Jans, D.A.; Martin, A.J. Nucleocytoplasmic Trafficking of Dengue Non-Structural Protein 5 as a Target for Antivirals. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018, 1062, 199–213, doi:10.1007/978-981-10-8727-1_15.
- Giovannoni, F.; Ladelfa, F.; Monte, M.; Jans, D.A.; Hemmerich, P.; Garcia, C.C. Bodies in Infected Cells *w e i v Re In w e i v Re In*.
- Hiscox, J.A. The Interaction of Animal Cytoplasmic RNA Viruses with the Nucleus to Facilitate Replication. *Virus Res.* 2003, 95, 13–22, doi:10.1016/s0168-1702(03)00160-6.
- Tadano, M.; Makino, Y.; Fukunaga, T.; Okuno, Y.; Fukai, K. Detection of Dengue 4 Virus Core Protein in the Nucleus. I. A Monoclonal Antibody to Dengue 4 Virus Reacts with the Antigen in the Nucleus and Cytoplasm. *J. Gen. Virol.* 1989, 70 (Pt 6), 1409–1415, doi:10.1099/0022-1317-70-6-1409.
- Sangiambut, S.; Keelapang, P.; Aaskov, J.; Puttikhunt, C.; Kasinrerk, W.; Malasit, P.; Sittisombut, N. Multiple Regions in Dengue Virus Capsid Protein Contribute to Nuclear Localization during Virus Infection. *J. Gen. Virol.* 2008, 89, 1254–1264, doi:10.1099/vir.0.83264-0.
- Pryor, M.J.; Rawlinson, S.M.; Butcher, R.E.; Barton, C.L.; Waterhouse, T.A.; Vasudevan, S.G.; Bardin, P.G.; Wright, P.J.; Jans, D.A.; Davidson, A.D. Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 through Its Importin Alpha/Beta-Recognized Nuclear Localization Sequences Is Integral to Viral Infection. *Traffic* 2007, 8, 795–807, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00579.x.
- Fraser, J.E.; Rawlinson, S.M.; Heaton, S.M.; Jans, D.A. Dynamic Nuclear Targeting of Dengue Virus Polymerase NS5 in Response to Extracellular PH. *J. Virol.* 2016, 90, 5797–5807, doi:10.1128/JVI.02727-15.
- Reyes-Ruiz, J.M.; Osuna-Ramos, J.F.; Cervantes-Salazar, M.; Lagunes Guillen, A.E.; Chávez-Munguía, B.; Salas-Benito, J.S.; Del Ángel, R.M. Strand-like Structures and the Nonstructural Proteins 5, 3 and 1 Are Present in the Nucleus of Mosquito Cells Infected with Dengue Virus. *Virology* 2018, 515, 74–80, doi:10.1016/j.virol.2017.12.014.
- Palacios-Rápalo, S.N.; De Jesús-González, L.A.; Reyes-Ruiz, J.M.; Osuna-Ramos, J.F.; Farfán-Morales, C.N.; Gutiérrez-Escolano, A.L.; Del Ángel, R.M. Nuclear Localization of Non-Structural Protein 3 (NS3) during Dengue Virus Infection. *Arch. Virol.* 2021, 166, 1439–1446, doi:10.1007/s00705-021-05026-w.
- Uno, N.; Ross, T.M. Dengue Virus and the Host Innate Immune Response. *Emerg. Microbes Infect.* 2018, 7.
- Chen, R.F.; Yeh, W.T.; Yang, M.Y.; Yang, K.D. A Model of the Real-Time Correlation of Viral Titers with Immune Reactions in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue-2 Infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001, 30, 1–7, doi:10.1016/S0928-8244(00)00225-X.
- Nivarthi, U.K.; Swannstrom, J.; Delacruz, M.J.; Patel, B.; Durbin, A.P.; Whitehead, S.S.; Kirkpatrick, B.D.; Pierce, K.K.; Diehl, S.A.; Katzelnick, L.; et al. A Tetravalent Live Attenuated Dengue Virus Vaccine Stimulates Balanced Immunity to Multiple

- Serotypes in Humans. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-21384-0.
27. Hahn, M.E.; Karchner, S.I.; Merson, R.R. Diversity as Opportunity: Insights from 600 Million Years of AHR Evolution. *Curr. Opin. Toxicol.* **2017**, *2*, 58–71.
 28. Kewley, R.J.; Whitelaw, M.L.; Chapman-Smith, A. The Mammalian Basic Helix-Loop-Helix/PAS Family of Transcriptional Regulators. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*; 2004; Vol. 36, pp. 189–204.
 29. Harper, P.A.; Riddick, D.S.; Okey, A.B. Regulating the Regulator: Factors That Control Levels and Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor. In *Biochemical Pharmacology*; 2006; Vol. 72, pp. 267–279.
 30. Yamamoto, J.; Ihara, K.; Nakayama, H.; Hikino, S.; Satoh, K.; Kubo, N.; Iida, T.; Fujii, Y.; Hara, T. Characteristic Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Gene in Human Tissues: Organ-Specific Distribution and Variable Induction Patterns in Mononuclear Cells. In *Life Sciences*; 2004; Vol. 74, pp. 1039–1049 ISBN 8192642542.
 31. Yi, T.; Wang, J.; Zhu, K.; Tang, Y.; Huang, S.; Shui, X.; Ding, Y.; Chen, C.; Lei, W. Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. In *BioMed Research International*; 2018; Vol. 2018.
 32. Dolciemi, D.; Ballarotto, M.; Gargaro, M.; López-Cara, L.C.; Fallarino, F.; Macchiarulo, A. Targeting Aryl Hydrocarbon Receptor for Next-Generation Immunotherapies: Selective Modulators (SAhRMs) versus Rapidly Metabolized Ligands (RMAhRLs). *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, doi:10.1016/j.ejmech.2019.111842.
 33. Harper, P.A.; Riddick, D.S.; Okey, A.B. Regulating the Regulator: Factors That Control Levels and Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 267–279, doi:10.1016/j.bcp.2006.01.007.
 34. Larigot, L.; Juricek, L.; Dairou, J.; Coumoul, X. AhR Signaling Pathways and Regulatory Functions. *Biochim. Open* **2018**, *7*, 1–9, doi:10.1016/j.biopen.2018.05.001.
 35. Rothhammer, V.; Quintana, F.J. The Aryl Hydrocarbon Receptor: An Environmental Sensor Integrating Immune Responses in Health and Disease. In *Nature Reviews Immunology*; Springer US, 2019; Vol. 19, pp. 184–197.
 36. Salminen, A. Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Reveals Evidence of Antagonistic Pleiotropy in the Regulation of the Aging Process. *Cell. Mol. Life Sci.* **2022**, *79*.
 37. Wright, E.J.; Pereira De Castro, K.; Joshi, A.D.; Elferink, C.J. Canonical and Non-Canonical Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathways. *Curr. Opin. Toxicol.* **2017**, *2*, 87–92, doi:10.1016/j.cotox.2017.01.001.
 38. Wu, D.; Potluri, N.; Kim, Y.; Rastinejad, F. Structure and Dimerization Properties of the Aryl Hydrocarbon Receptor PAS-A Domain. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 4346–4356, doi:10.1128/mcb.00698-13.
 39. Wang, Q.; VonHandorf, A.; Puga, A. Aryl Hydrocarbon Receptor. In *Encyclopedia of Signaling Molecules*; Choi, S., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2016; pp. 1–15 ISBN 978-1-4614-6438-9.
 40. Faber, S.C.; Soshilov, A.A.; Giani Tagliabue, S.; Bonati, L.; Denison, M.S. Comparative in Vitro and in Silico Analysis of the Selectivity of Indirubin as a Human Ah Receptor Agonist. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19092692.
 41. Beischlag, T. V.; Morales, J.L.; Hollingshead, B.D.; Perdew, G.H. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2008**, *18*, 207–250, doi:10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v18.i3.20.
 42. Carver, L.A.; Lapres, J.J.; Jain, S.; Dunham, E.E.; Bradfield, C.A. Characterization of the Ah Receptor-Associated Protein, ARA9. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33580–33587, doi:10.1074/jbc.273.50.33580.
 43. Cox, M.B.; Miller, C.A. The P23 Co-Chaperone Facilitates Dioxin Receptor Signaling in a Yeast Model System. *Toxicol. Lett.* **2002**, *129*, 13–21, doi:10.1016/S0378-4274(01)00465-9.
 44. Kudo, I.; Hosaka, M.; Haga, A.; Tsuji, N.; Nagata, Y.; Okada, H.; Fukuda, K.; Kakizaki, Y.; Okamoto, T.; Grave, E.; et al. The Regulation Mechanisms of AhR by Molecular Chaperone Complex. *J. Biochem.* **2018**, *163*, 223–232, doi:10.1093/jb/mvx074.
 45. Meyer, B.K.; Pray-Grant, M.G.; Vanden Heuvel, J.P.; Perdew, G.H. Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 Is a Subunit of the Unliganded Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex and Exhibits Transcriptional Enhancer Activity. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 978–988, doi:10.1128/mcb.18.2.978.
 46. Meyer, B.K.; Perdew, G.H. Characterization of the AhR-Hsp90-XAP2 Core Complex and the Role of the Immunophilin-Related Protein XAP2 in AhR Stabilization. *Biochemistry* **1999**, *38*, 8907–8917, doi:10.1021/bi982223w.
 47. Petrulis, J.R.; Perdew, G.H. The Role of Chaperone Proteins in the Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex. *Chem. Biol. Interact.* **2002**, *141*, 25–40, doi:10.1016/S0009-2797(02)00064-9.
 48. Seok, S.H.; Lee, W.; Jiang, L.; Molugu, K.; Zheng, A.; Li, Y.; Park, S.; Bradfield, C.A.; Xing, Y. Structural Hierarchy Controlling Dimerization and Target DNA Recognition in the AHR Transcriptional Complex. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 2017; Vol. 114, pp. 5431–5436 ISBN 1617035114.
 49. Uemura, S.; Nakajima, Y.; Yoshida, Y.; Furuya, M.; Matsutani, S.; Kawate, S.; Ikeda, S.I.; Tsuji, N.; Grave, E.; Wakui, H.; et al. Biochemical Properties of Human Full-Length Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). *J. Biochem.* **2020**, *168*, 285–294, doi:10.1093/jb/mvaa047.
 50. Nguyen, P.M.; Wang, D.; Wang, Y.; Li, Y.; Uchizono, J.A.; Chan, W.K. P23 Co-Chaperone Protects the Aryl Hydrocarbon Receptor from Degradation in Mouse and Human Cell Lines. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 838–850, doi:10.1016/j.bcp.2012.06.018.
 51. Pappas, B.; Yang, Y.; Wang, Y.; Kim, K.; Chung, H.J.; Cheung, M.; Ngo, K.; Shinn, A.; Chan, W.K. P23 Protects the Human Aryl Hydrocarbon Receptor From Degradation Via a Heat Shock Protein 90-Independent Mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *152*, 34–44, doi:10.1016/j.bcp.2018.03.015.

52. Petrusis, J.R.; Kusnadi, A.; Ramadoss, P.; Hollingshead, B.; Perdew, G.H. The Hsp90 Co-Chaperone XAP2 Alters Importin β Recognition of the Bipartite Nuclear Localization Signal of the Ah Receptor and Represses Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2677–2685, doi:10.1074/jbc.M209331200.
53. Tsuji, N.; Fukuda, K.; Nagata, Y.; Okada, H.; Haga, A.; Hatakeyama, S.; Yoshida, S.; Okamoto, T.; Hosaka, M.; Sekine, K.; et al. The Activation Mechanism of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by Molecular Chaperone HSP90. *FEBS Open Bio* **2014**, *4*, 796–803, doi:10.1016/j.fob.2014.09.003.
54. Berg, P.; Pongratz, I. Two Parallel Pathways Mediate Cytoplasmic Localization of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32310–32319, doi:10.1074/jbc.M203351200.
55. Ikuta, T.; Eguchi, H.; Tachibana, T.; Yoneda, Y.; Kawajiri, K. Nuclear Localization and Export Signals of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2895–2904, doi:10.1074/jbc.273.5.2895.
56. Kazlauskas, A.; Sundström, S.; Poellinger, L.; Pongratz, I. The Hsp90 Chaperone Complex Regulates Intracellular Localization of the Dioxin Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 2594–2607, doi:10.1128/mcb.21.7.2594-2607.2001.
57. Henry, E.C.; Gasiewicz, T.A. Transformation of the Aryl Hydrocarbon Receptor to a DNA-Binding Form Is Accompanied by Release of the 90 KDa Heat-Shock Protein and Increased Affinity for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Biochem. J.* **1993**, *294*, 95–101, doi:10.1042/bj2940095.
58. Sondermann, N.C.; Faßbender, S.; Hartung, F.; Hätälä, A.M.; Rolfes, K.M.; Vogel, C.F.A.; Haarmann-Stemann, T. Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) beyond the Canonical AHR/ARNT Signaling Pathway. *Biochem. Pharmacol.* **2023**, *208*, 1–50, doi:10.1016/j.bcp.2022.115371.
59. Jin, H.L.; Choi, Y.; Jeong, K.W. Crosstalk between Aryl Hydrocarbon Receptor and Glucocorticoid Receptor in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Int. J. Endocrinol.* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/5679517.
60. Wilson, S.R.; Joshi, A.D.; Elferink, C.J. The Tumor Suppressor Kruppel-like Factor 6 Is a Novel Aryl Hydrocarbon Receptor DNA Binding Partner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *345*, 419–429, doi:10.1124/jpet.113.203786.
61. Billiard, S.M.; Hahn, M.E.; Franks, D.G.; Peterson, R.E.; Bols, N.C.; Hodson, P. V. Binding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) to Teleost Aryl Hydrocarbon Receptors (AHRs). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *133*, 55–68, doi:10.1016/S1096-4959(02)00105-7.
62. Mimura, J.; Fujii-Kuriyama, Y. Functional Role of AhR in the Expression of Toxic Effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2003**, *1619*, 263–268, doi:10.1016/S0304-4165(02)00485-3.
63. Baccarelli, A.; Pesatori, A.C.; Masten, S.A.; Patterson, D.G.; Needham, L.L.; Mocarelli, P.; Caporaso, N.E.; Consonni, D.; Grassman, J.A.; Bertazzi, P.A.; et al. Aryl-Hydrocarbon Receptor-Dependent Pathway and Toxic Effects of TCDD in Humans: A Population-Based Study in Seveso, Italy. *Toxicol. Lett.* **2004**, *149*, 287–293, doi:10.1016/j.toxlet.2003.12.062.
64. Dolciemi, D.; Ballarotto, M.; Gargaro, M.; López-Cara, L.C.; Fallarino, F.; Macchiarulo, A. Targeting Aryl Hydrocarbon Receptor for Next-Generation Immunotherapies: Selective Modulators (SAhRMs) versus Rapidly Metabolized Ligands (RMAhRLs). In *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2020; Vol. 185.
65. Sorg, O. AhR Signalling and Dioxin Toxicity. *Toxicol. Lett.* **2014**, *230*, 225–233, doi:10.1016/j.toxlet.2013.10.039.
66. Vanden Heuvel, J.P.; Lucier, G. Environmental Toxicology of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. *Environ. Health Perspect.* **1993**, *100*, 189–200, doi:10.1289/ehp.93100189.
67. Zack, J.A.; Suskind, R.R. The Mortality Experience of Workers Exposed to Tetrachlorodibenzodioxin in a Trichlorophenol Process Accident. In *Journal of occupational medicine. : official publication of the Industrial Medical Association*; United States, 1980; Vol. 22, pp. 11–14.
68. Denison, M.S.; Soshilov, A.A.; He, G.; Degroot, D.E.; Zhao, B. Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *Toxicol. Sci.* **2011**, *124*, 1–22, doi:10.1093/toxsci/kfr218.
69. Murray, I.A.; Patterson, A.D.; Perdew, G.H. Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Cancer: Friend and Foe. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 801–814, doi:10.1038/nrc3846.
70. Schroeder, J.C.; DiNatale, B.C.; Murray, I.A.; Flaveny, C.A.; Liu, Q.; Laurenzana, E.M.; Lin, J.M.; Strom, S.C.; Omiecinski, C.J.; Amin, S.; et al. The Uremic Toxin 3-Indoxyl Sulfate Is a Potent Endogenous Agonist for the Human Aryl Hydrocarbon Receptor. In *Biochemistry*; 2010; Vol. 49, pp. 393–400.
71. Zhao, B.; DeGroot, D.E.; Hayashi, A.; He, G.; Denison, M.S. Ch223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicol. Sci.* **2010**, *117*, 393–403, doi:10.1093/toxsci/kfq217.
72. Bilir, C.; Sarisozen, C. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO): Only an Enzyme or a Checkpoint Controller? *J. Oncol. Sci.* **2017**, *3*, 52–56, doi:10.1016/j.jons.2017.04.001.
73. Gasiewicz, T.A.; Kende, A.S.; Rucci, G.; Whitney, B.; Willey, J.J. Analysis of Structural Requirements for Ah Receptor Antagonist Activity: Ellipticines, Flavones, and Related Compounds. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1787–1803, doi:10.1016/S0006-2952(96)00600-4.
74. Gasiewicz, T. and; Rucci, G. Alpha-Naphthoflavone Acts as an Antagonist of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin by Forming an Inactive Complex with the Ah Receptor.
75. Henry, E.C.; Kende, A.S.; Rucci, G.; Totleben, M.J.; Willey, J.J.; Dertinger, S.D.; Pollenz, R.S.; Jones, J.P.; Gasiewicz, T.A. Flavone Antagonists Bind Competitively with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p-Dioxin (TCDD) to the Aryl Hydrocarbon Receptor but Inhibit Nuclear Uptake and Transformation. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 716–725.
76. Kim, S.; Henry, E.C.; Kim, D.; Kim, Y.; Shin, K.J.;

- Han, M.S.; Lee, T.G.; Kang, J.; Gasiewicz, T. a; Ryu, S.H.; et al. Novel Compound 2-Methyl-2H-Pyrazole-3-Carboxylic Acid Aryl Hydrocarbon Receptor. In *Molecular Pharmacology*; 2006; Vol. 69, pp. 1871–1878.
77. Merchant, M.; Arellano, L.; Safe, S. The Mechanism of Action of α -Naphthoflavone as an Inhibitor of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin-Induced CYP1A1 Gene Expression. In *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 1990; Vol. 281, pp. 84–89.
78. Gutiérrez-Vázquez, C.; Quintana, F.J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* **2018**, *48*, 19–33, doi:10.1016/j.immuni.2017.12.012.
79. Neavin, D.R.; Liu, D.; Ray, B.; Weinshilboum, R.M. The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19123851.
80. Patrizi, B.; de Cumis, M.S. TCDD Toxicity Mediated by Epigenetic Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1–15, doi:10.3390/ijms19124101.
81. Quintana, F.J.; Sherr, D.H. Aryl Hydrocarbon Receptor Control of Adaptive Immunity. In *Pharmacological Reviews*; 2013; Vol. 65, pp. 1148–1161.
82. Ishihara, Y.; Kado, S.Y.; Hoepfer, C.; Harel, S.; Vogel, C.F.A. Role of Nf-Kb RelB in Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Ligand Specific Effects. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20112652.
83. Pfeffer, L.M.; Kim, J.G.; Pfeffer, S.R.; Carrigan, D.J.; Baker, D.P.; Weill, L.; Homayouni, R. Role of Nuclear Factor-KB in the Antiviral Action of Interferon and Interferon-Regulated Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31304–31311, doi:10.1074/jbc.M308975200.
84. Tian, Y.; Rabson, A.B.; Gallo, M.A. Ah Receptor and NF-KB Interactions: Mechanisms and Physiological Implications. In *Chemico-Biological Interactions*; 2002; Vol. 141, pp. 97–115 ISBN 1979458359.
85. Vogel, C.F.A.; Khan, E.M.; Leung, P.S.C.; Gershwin, M.E.; Chang, W.L.W.; Wu, D.; Haarmann-Stemann, T.; Hoffmann, A.; Denison, M.S. Cross-Talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and the Inflammatory Response: A Role for Nuclear Factor-KB. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 1866–1875, doi:10.1074/jbc.M113.505578.
86. Yamada, T.; Horimoto, H.; Kameyama, T.; Hayakawa, S.; Yamato, H.; Dazai, M.; Takada, A.; Kida, H.; Bott, D.; Zhou, A.C.; et al. Constitutive Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Constrains Type I Interferon-Mediated Antiviral Innate Defense. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 687–694, doi:10.1038/ni.3422.
87. Torti, M.F.; Giovannoni, F.; Quintana, F.J.; García, C.C. The Aryl Hydrocarbon Receptor as a Modulator of Anti-Viral Immunity. In *Frontiers in Immunology*; 2021; Vol. 12, pp. 1–14.
88. Asha, K.; Balfe, N.; Sharma-Walia, N. Concurrent Control of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Life Cycle through Chromatin Modulation and Host Hedgehog Signaling: A New Prospect for the Therapeutic Potential of Lipoxin A4. *J. Virol.* **2020**, *94*, doi:10.1128/jvi.02177-19.
89. Teske, S.; Bohn, A.A.; Regal, J.F.; Neumiller, J.J.; Lawrence, B.P. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Increases Pulmonary Neutrophilia and Diminishes Host Resistance to Influenza A Virus. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2005**, *289*, doi:10.1152/ajplung.00318.2004.
90. Teske, S.; Bohn, A.A.; Hogaboam, J.P.; Lawrence, B.P. Aryl Hydrocarbon Receptor Targets Pathways Extrinsic to Bone Marrow Cells to Enhance Neutrophil Recruitment during Influenza Virus Infection. *Toxicol. Sci.* **2008**, *102*, 89–99, doi:10.1093/toxsci/kfm282.
91. Vaidyanathan, B.; Chaudhry, A.; Yewdell, W.T.; Angeletti, D.; Yen, W.F.; Wheatley, A.K.; Bradfield, C.A.; McDermott, A.B.; Yewdell, J.W.; Rudensky, A.Y.; et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Cell-Fate Decisions in B Cells. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 197–208, doi:10.1084/jem.20160789.
92. Veiga-Parga, T.; Suryawanshi, A.; Rouse, B.T. Controlling Viral Immuno-Inflammatory Lesions by Modulating Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, 1–16, doi:10.1371/journal.ppat.1002427.
93. Vorderstrasse, B.A.; Bohn, A.A.; Lawrence, B.P. Examining the Relationship between Impaired Host Resistance and Altered Immune Function in Mice Treated with TCDD. *Toxicology* **2003**, *188*, 15–28, doi:10.1016/S0300-483X(02)00749-7.
94. Wheeler, J.L.H.; Martin, K.C.; Lawrence, B.P. Novel Cellular Targets of AhR Underlie Alterations in Neutrophilic Inflammation and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression during Influenza Virus Infection. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 659–668, doi:10.4049/jimmunol.1201341.
95. Zhou, Y.; Li, S.; Huang, L.; Yang, Y.; Zhang, L.; Yang, M.; Liu, W.; Ramasamy, K.; Jiang, Z.; Sundaresan, P.; et al. A Splicing Mutation in Aryl Hydrocarbon Receptor Associated with Retinitis Pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 2563–2572, doi:10.1093/hmg/ddy165.
96. Buonomo, T.; Carraresi, L.; Rossini, M.; Martinelli, R. Involvement of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in the Development of Small Cell Lung Cancer Induced by HPV E6/E7 Oncoproteins. *J. Transl. Med.* **2011**, *9*, 2, doi:10.1186/1479-5876-9-2.
97. Dierks, P.; Wroblewski, R.; Eberhard, J.M.; Martrus, G.; Degen, O.; Hertling, S.; Schmiedel, S.; Lunemann, S.; Hüfner, A.; Lohse, A.W.; et al. Increased Frequency of CD39⁺ CD56bright Natural Killer Cells in HIV-1 Infection Correlates with Immune Activation and Disease Progression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2017**, *74*, 467–472, doi:10.1097/QAI.0000000000001266.
98. Franchini, A.M.; Lawrence, B.P. Environmental Exposures Are Hidden Modifiers of Anti-Viral Immunity. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *10*, 54–59, doi:10.1016/j.cotox.2018.01.004.
99. Giovannoni, F.; Bosch, I.; Polonio, C.M.; Torti, M.F.; Wheeler, M.A.; Li, Z.; Romorini, L.; Rodriguez Varela, M.S.; Rothhammer, V.; Barroso, A.; et al. AHR Is a Zika Virus Host Factor and a Candidate Target for Antiviral Therapy. *Nat. Neurosci.* **2020**, *23*, 939–951, doi:10.1038/s41593-020-0664-0.
100. Hong, W.; Cheng, W.; Zheng, T.; Jiang, N.; Xu, R. AHR Is a Tunable Knob That Controls HTLV-1

- Latency-Reactivation Switching. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, doi:10.1371/journal.ppat.1008664.
101. Inoue, H.; Mishima, K.; Yamamoto-Yoshida, S.; Ushikoshi-Nakayama, R.; Nakagawa, Y.; Yamamoto, K.; Ryo, K.; Ide, F.; Saito, I. Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of EBV Reactivation as a Risk Factor for Sjögren's Syndrome. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 4654–4662, doi:10.4049/jimmunol.1101575.
 102. Murayama, T.; Inoue, M.; Nomura, T.; Mori, S.; Eizuru, Y. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Is a Possible Activator of Human Cytomegalovirus Replication in a Human Fibroblast Cell Line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 651–656, doi:10.1016/S0006-291X(02)00921-X.
 103. Ohashi, H.; Nishioka, K.; Nakajima, S.; Kim, S.; Suzuki, R.; Aizaki, H.; Fukasawa, M.; Kamisuki, S.; Sugawara, F.; Ohtani, N.; et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor-Cytochrome P450 1A1 Pathway Controls Lipid Accumulation and Enhances the Permissiveness for Hepatitis C Virus Assembly. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 19559–19571, doi:10.1074/jbc.RA118.005033.
 104. Iijima, K.; Okudaira, N.; Tamura, M.; Doi, A.; Saito, Y.; Shimura, M.; Goto, M.; Matsunaga, A.; Kawamura, Y.I.; Otsubo, T.; et al. Viral Protein R of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Induces Retrotransposition of Long Interspersed Element-1. *Retrovirology* **2013**, *10*, 1, doi:10.1186/1742-4690-10-83.
 105. Naseri-Nosar, P.; Nogalski, M.T.; Shenk, T. The Aryl Hydrocarbon Receptor Facilitates the Human Cytomegalovirus-Mediated G1/S Block to Cell Cycle Progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, doi:10.1073/pnas.2026336118.
 106. Giovannoni, F.; Quintana, F.J. SARS-CoV-2-Induced Lung Pathology: AHR as a Candidate Therapeutic Target. In *Cell Research*; Springer US, 2021; Vol. 31, pp. 2020–2021.
 107. Giovannoni, F.; Li, Z.; Remes-Lenicov, F.; Dávola, M.E.; Elizalde, M.; Paletta, A.; Ashkar, A.A.; Mossman, K.L.; Dugour, A. V.; Figueroa, J.M.; et al. AHR Signaling Is Induced by Infection with Coronaviruses. In *Nature Communications*; Nature Research, 2021; Vol. 12.
 108. Anderson, G.; Reiter, R.J. Melatonin: Roles in Influenza, Covid-19, and Other Viral Infections. *Rev. Med. Virol.* **2020**, *30*, 1–10, doi:10.1002/rmv.2109.
 109. Tanimoto, K.; Hirota, K.; Fukazawa, T.; Matsuo, Y.; Nomura, T.; Tanuza, N.; Hirohashi, N.; Bono, H.; Sakaguchi, T. Inhibiting SARS-CoV-2 Infection in Vitro by Suppressing Its Receptor, Angiotensin-Converting Enzyme 2, via Aryl-Hydrocarbon Receptor Signal. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, doi:10.1038/s41598-021-96109-w.
 110. Pelaez, M.A.; Torti, M.F.; Alvarez De Lauro, A.E.; Marquez, A.B.; Giovannoni, F.; Damonte, E.B.; García, C.C. Modulation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway Impacts on Junin Virus Replication. *Viruses* **2023**, *15*, doi:10.3390/v15020369.
 111. Funseth, E.; Wesslén, L.; Lindh, U.; Friman, G.; Ilbäck, N.G. Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Trace Elements, Inflammation and Viral Clearance in the Myocardium during Coxsackievirus B3 Infection in Mice. *Sci. Total Environ.* **2002**, *284*, 135–147, doi:10.1016/S0048-9697(01)00874-9.
 112. Funseth, E.; Ilbäck, N.G. Coxsackievirus B3 Infection Alters the Uptake of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin into Various Tissues of the Mouse. *Toxicology* **1994**, *90*, 29–38, doi:10.1016/0300-483X(94)90202-X.
 113. Kueck, T.; Cassella, E.; Holler, J.; Kim, B.; Bieniasz, P.D. The Aryl Hydrocarbon Receptor and Interferon Gamma Generate Antiviral States via Transcriptional Repression. *Elife* **2018**, *7*, 1–22, doi:10.7554/eLife.38867.
 114. Duan, Z.; Deng, S.; Ji, X.; Zhao, J.; Yuan, C.; Gao, H. Nuclear Localization of Newcastle Disease Virus Matrix Protein Promotes Virus Replication by Affecting Viral RNA Synthesis and Transcription and Inhibiting Host Cell Transcription. *Vet. Res.* **2019**, *50*, 1–19, doi:10.1186/s13567-019-0640-4.
 115. Fiorito, F.; Cantiello, A.; Granato, G.E.; Marfè, G.; Ciarcia, R.; Florio, S.; Pagnini, U.; De Martino, L.; Iovane, G. Modulation of Telomerase Activity, BERT and c-Myc Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin during Bovine Herpesvirus 1 Infection in MDBK Cells. *Toxicol. Vitro* **2014**, *28*, 24–30, doi:10.1016/j.tiv.2013.06.020.
 116. Grunewald, M.E.; Shaban, M.G.; Mackin, S.R.; Fehr, A.R.; Perlman, S. Murine Coronavirus Infection Activates the Aryl Hydrocarbon Receptor in an Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Independent Manner, Contributing to Cytokine Modulation and Proviral TCDD-Inducible-PARP Expression. *J. Virol.* **2019**, *94*, 319–335, doi:10.1128/jvi.01743-19.
 117. Ross, P.S.; Van Loveren, H.; De Swart, R.L.; Van Der Vliet, H.; De Klerk, A.; Timmerman, H.H.; Van Binnendijk, R.; Brouwer, A.; Vos, J.G.; Osterhaus, A.D.M.E. Host Resistance to Rat Cytomegalovirus (RCMV) and Immune Function in Adult PVG Rats Fed Herring from the Contaminated Baltic Sea. *Arch. Toxicol.* **1996**, *70*, 661–671, doi:10.1007/s002040050326.
 118. Ross, P.S.; De Swart, R.L.; Van der Vliet, H.; Willemsen, L.; De Klerk, A.; Van Amerongen, G.; Groen, J.; Brouwer, A.; Schipholt, I.; Morse, D.C.; et al. Impaired Cellular Immune Response in Rats Exposed Perinatally to Baltic Sea Herring Oil or 2,3,7,8-TCDD. *Arch. Toxicol.* **1997**, *71*, 563–574, doi:10.1007/s002040050428.
 119. Cerracchio, C.; Serra, F.; Amoroso, M.G.; Fiorito, F. Canine Coronavirus Activates Aryl Hydrocarbon Receptor during In Vitro Infection. *Viruses* **2022**, *14*, doi:10.3390/v14112437.
 120. Jin, G.B.; Moore, A.J.; Head, J.L.; Neumiller, J.J.; Lawrence, B.P. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Reduces Dendritic Cell Function during Influenza Virus Infection. *Toxicol. Sci.* **2010**, *116*, 514–522, doi:10.1093/toxsci/kfq153.
 121. Lawrence, B.P.; Vorderstrasse, B.A. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Diminishes the Memory Response to Homotypic Influenza Virus Infection but Does Not Impair Host Resistance. *Toxicol. Sci.* **2004**, *79*, 304–314, doi:10.1093/toxsci/kfh094.
 122. Neff-LaFord, H.D.; Vorderstrasse, B.A.; Lawrence, B.P. Fewer CTL, Not Enhanced NK Cells, Are Sufficient for Viral Clearance from the Lungs of Immunocompromised Mice. *Cell. Immunol.* **2003**, *226*, 54–64, doi:10.1016/j.cellimm.2003.11.005.

123. Neff-LaFord, H.; Teske, S.; Bushnell, T.P.; Lawrence, B.P. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation during Influenza Virus Infection Unveils a Novel Pathway of IFN- γ Production by Phagocytic Cells. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 247–255, doi:10.4049/jimmunol.179.1.247.
124. Warren, T.K.; Mitchell, K.A.; Lawrence, B.P. Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Suppresses the Humoral and Cell-Mediated Immune Responses to Influenza A Virus without Affecting Cytolytic Activity in the Lung. *Toxicol. Sci.* **2000**, *56*, 114–123, doi:10.1093/toxsci/56.1.114.
125. Wheeler, J.L.H.; Martin, K.C.; Resseguie, E.; Paige Lawrence, B. Differential Consequences of Two Distinct AhR Ligands on Innate and Adaptive Immune Responses to Influenza A Virus. *Toxicol. Sci.* **2014**, *137*, 324–334, doi:10.1093/toxsci/kft255.
126. Lawrence, B.P.; Roberts, A.D.; Neumiller, J.J.; Cundiff, J.A.; Woodland, D.L. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Impairs the Priming but Not the Recall of Influenza Virus-Specific CD8 + T Cells in the Lung. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 5819–5828, doi:10.4049/jimmunol.177.9.5819.
127. Elbi, C.; Misteli, T.; Hager, G.L. Recruitment of Dioxin Receptor to Active Transcription Sites. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 2001–2015, doi:10.1091/mboc.13.6.mk0602002001.
128. Kado, S.; Chang, W.L.W.; Chi, A.N.; Wolny, M.; Shepherd, D.M.; Vogel, C.F.A. Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Modifies Toll-like Receptor-Regulated Responses in Human Dendritic Cells. In *Archives of Toxicology*; Springer Verlag, 2017; Vol. 91, pp. 2209–2221.
129. Zablocki-Thomas, L.; Menzies, S.A.; Lehner, P.J.; Manel, N.; Benaroch, P. A Genome-Wide CRISPR Screen Identifies Regulation Factors of the TLR3 Signalling Pathway. In *Innate Immunity*; SAGE Publications Ltd, 2020; Vol. 26, pp. 459–472.
130. Brand, P.; Lenser, T.; Hemmerich, P. Assembly Dynamics of PML Nuclear Bodies in Living Cells. In; 2010 ISBN 17575036/3/3.
131. Hemmerich, P.; Diekmann, S. *Visions of the Cell Nucleus*; Amer Scientific Pub, 2005; Vol. 831; ISBN 1588830276.
132. Lallemand-Breitenbach, V.; de Thé, H. PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*.
133. Weidtkamp-Peters, S.; Lenser, T.; Negorev, D.; Gerstner, N.; Hofmann, T.G.; Schwantz, G.; Hoischen, C.; Maul, G.; Dittrich, P.; Hemmerich, P. Dynamics of Component Exchange at PML Nuclear Bodies. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2731–2743, doi:10.1242/jcs.031922.
134. Nisole, S.; Maroui, M.A.; Mascle, X.H.; Aubry, M.; Chelbi-Alix, M.K. Differential Roles of PML Isoforms. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 125, doi:10.3389/fonc.2013.00125.
135. Atwan, Z.; Wright, J.; Woodman, A.; Leppard, K.N. Promyelocytic Leukemia Protein Isoform II Inhibits Infection by Human Adenovirus Type 5 through Effects on HSP70 and the Interferon Response. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 1955–1967, doi:10.1099/jgv.0.000510.
136. Giovannoni, F. Rol Antiviral Intrínseco de PML En La Infección Con Flavivirus. In; 2018.
137. Scherer, M.; Stamming, T. Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5850–5854, doi:10.1128/JVI.01979-15.
138. Lang, M.; Jegou, T.; Chung, I.; Richter, K.; Münch, S.; Udvarhelyi, A.; Cremer, C.; Hemmerich, P.; Engelhardt, J.; Hell, S.W.; et al. Three-Dimensional Organization of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 392–400, doi:10.1242/jcs.053496.
139. Van Damme, E.; Laukens, K.; Dang, T.H.; Van Ostade, X. A Manually Curated Network of the PML Nuclear Body Interactome Reveals an Important Role for PML-NBs in SUMOylation Dynamics. *Int. J. Biol. Sci.* **2010**, *6*, 51–67, doi:10.7150/ijbs.6.51.
140. Bernardi, R.; Pandolfi, P.P. Structure, Dynamics and Functions of Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 1006–1016.
141. Dellaire, G.; Bazett-Jones, D.P. PML Nuclear Bodies: Dynamic Sensors of DNA Damage and Cellular Stress. *Bioessays* **2004**, *26*, 963–977, doi:10.1002/bies.20089.
142. Hoischen, C.; Monajembashi, S.; Weissart, K.; Hemmerich, P. Multimodal Light Microscopy Approaches to Reveal Structural and Functional Properties of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 125, doi:10.3389/fonc.2018.00125.
143. Guccione, E.; Lethbridge, K.J.; Killick, N.; Leppard, K.N.; Banks, L. HPV E6 Proteins Interact with Specific PML Isoforms and Allow Distinctions to Be Made between Different POD Structures. *Oncogene* **2004**, *23*, 4662–4672, doi:10.1038/sj.onc.1207631.
144. Geoffroy, M.-C.; Chelbi-Alix, M.K. Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Host Antiviral Defense. *J. Interf. cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.* **2011**, *31*, 145–158, doi:10.1089/jir.2010.0111.
145. Borden, K.L.; Campbell Dwyer, E.J.; Salvato, M.S. An Arenavirus RING (Zinc-Binding) Protein Binds the Oncoprotein Promyelocyte Leukemia Protein (PML) and Relocates PML Nuclear Bodies to the Cytoplasm. *J. Virol.* **1998**, *72*, 758–766, doi:10.1128/JVI.72.1.758-766.1998.
146. Blondel, D.; Regad, T.; Poisson, N.; Pavie, B.; Harper, F.; Pandolfi, P.P.; De Thé, H.; Chelbi-Alix, M.K. Rabies Virus P and Small P Products Interact Directly with PML and Reorganize PML Nuclear Bodies. *Oncogene* **2002**, *21*, 7957–7970, doi:10.1038/sj.onc.1205931.
147. El McHichi, B.; Regad, T.; Maroui, M.-A.; Rodriguez, M.S.; Aminev, A.; Gerbaud, S.; Escriviou, N.; Dianoux, L.; Chelbi-Alix, M.K. SUMOylation Promotes PML Degradation during Encephalomyocarditis Virus Infection. *J. Virol.* **2010**, *84*, 11634–11645, doi:10.1128/JVI.01321-10.
148. Giovannoni, F.; Ladelfa, M.F.; Monte, M.; Jans, D.A.; Hemmerich, P.; García, C. Dengue Non-Structural Protein 5 Polymerase Complexes With Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Isoforms III and IV to Disrupt PML-Nuclear Bodies in Infected Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 284, doi:10.3389/fcimb.2019.00284.
149. Giovannoni, F.; Damonte, E.B.; García, C.C. Cellular Promyelocytic Leukemia Protein Is an

- Important Dengue Virus Restriction Factor. *PLoS One* **2015**, *10*, e0125690, doi:10.1371/journal.pone.0125690.
150. Tojo, M.; Matsuzaki, K.; Minami, T.; Honda, Y.; Yasuda, H.; Chiba, T.; Saya, H.; Fujii-Kuriyama, Y.; Nakao, M. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Transporter Is Modulated by the SUMO-1 Conjugation System. In *Journal of Biological Chemistry*; © 2002 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 2002; Vol. 277, pp. 46576–46585.
 151. Elizondo, G.; Vega, L. Ubiquitination/Sumoylation: An Alternative Pathway to Modify Gene Regulation Directed by Xenosensors. In *Current Opinion in Toxicology*; Elsevier B.V., 2018; Vol. 8, pp. 81–86.
 152. Liu, E.; Hjelle, B.; Michael Bishop, J. *Transforming Genes in Chronic Myelogenous Leukemia (Oncogenes/Tumor Progression/Transfection/RAS)*; 1988; Vol. 85;.
 153. O'Bryan, J.P.; Frye, R.A.; Cogswell, P.C.; Neubauer, A.; Kitch, B.; Prokop, C.; Espinosa, R.; Le Beau, M.M.; Earp, H.S.; Liu, E.T. Axl, a Transforming Gene Isolated From Primary Human Myeloid Leukemia Cells, Encodes a Novel Receptor Tyrosine Kinase. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 5016–5031, doi:10.1128/mcb.11.10.5016-5031.1991.
 154. Meertens, L.; Carnec, X.; Lecoin, M.P.; Ramdasi, R.; Guivel-Benhassine, F.; Lew, E.; Lemke, G.; Schwartz, O.; Amara, A. *Supplemental Information The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry*;
 155. Lemke, G. Biology of the TAM Receptors. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology*; United States, 2013; Vol. 5, p. a009076.
 156. Sasaki, T.; Knyazev, P.G.; Clout, N.J.; Cheburkin, Y.; Göhring, W.; Ullrich, A.; Timpl, R.; Hohenester, E. Structural Basis for Gas6-Axl Signalling. In *EMBO Journal*; 2006; Vol. 25, pp. 80–87.
 157. Heiring, C.; Dahlbäck, B.; Muller, Y.A. Ligand Recognition and Homophilic Interactions in Tyro3: Structural Insights into the Axl/Tyro3 Receptor Tyrosine Kinase Family. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6952–6958, doi:10.1074/jbc.M311750200.
 158. Lemke, G.; Rothlin, C. V Immunobiology of the TAM Receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 327–336, doi:10.1038/nri2303.
 159. Mishra, A.; Wang, J.; Shiozawa, Y.; McGee, S.; Kim, J.; Jung, Y.; Joseph, J.; Berry, J.E.; Havens, A.; Pienta, K.J.; et al. Hypoxia Stabilizes Gas6/Axl Signaling in Metastatic Prostate Cancer. In *Molecular Cancer Research*; 2012; Vol. 10, pp. 703–712.
 160. Sharif, M.N.; Šošić, D.; Rothlin, C. V.; Kelly, E.; Lemke, G.; Olson, E.N.; Ivashkiv, L.B. Twist Mediates Suppression of Inflammation by Type I IFNs and Axl. In *Journal of Experimental Medicine*; 2006; Vol. 203, pp. 1891–1901.
 161. Curran, C.S.; Gupta, S.; Sanz, I.; Sharon, E. PD-1 Immunobiology in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Autoimmun.* **2019**, *97*, 1–9, doi:10.1016/j.jaut.2018.10.025.
 162. Nagata, K.; Ohashi, K.; Nakano, T.; Arita, H.; Zong, C.; Hanafusa, H.; Mizuno, K. Identification of the Product of Growth Arrest-Specific Gene 6 as a Common Ligand for Axl, Sky, and Mer Receptor Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30022–30027, doi:10.1074/jbc.271.47.30022.
 163. Rothlin, C. V.; Ghosh, S.; Zuniga, E.I.; Oldstone, M.B.A.; Lemke, G. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. In *Cell*; 2007; Vol. 131, pp. 1124–1136.
 164. Laureti, M.; Narayanan, D.; Rodriguez-Andres, J.; Fazakerley, J.K.; Kedzierski, L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. In *Frontiers in Immunology*; 2018; Vol. 9, pp. 1–11.
 165. Meertens, L.; Carnec, X.; Lecoin, M.P.; Ramdasi, R.; Guivel-Benhassine, F.; Lew, E.; Lemke, G.; Schwartz, O.; Amara, A. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 544–557, doi:10.1016/j.chom.2012.08.009.
 166. Tsai, K.Y.F.; Hirschi Budge, K.M.; Llavina, S.; Davis, T.; Long, M.; Bennett, A.; Sitton, B.; Arroyo, J.A.; Reynolds, P.R. RAGE and AXL Expression Following Secondhand Smoke (SHS) Exposure in Mice. In *Experimental Lung Research*; Taylor & Francis, 2019; Vol. 45, pp. 297–309.
 167. Wang, G.Z.; Zhang, L.; Zhao, X.C.; Gao, S.H.; Qu, L.W.; Yu, H.; Fang, W.F.; Zhou, Y.C.; Liang, F.; Zhang, C.; et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Tobacco-Induced PD-L1 Expression and Is Associated with Response to Immunotherapy. In *Nature Communications*; Springer US, 2019; Vol. 10, pp. 1–13.
 168. Meertens, L.; Labeau, A.; Dejarnac, O.; Cipriani, S.; Sinigaglia, L.; Bonnet-Madin, L.; Le Charpentier, T.; Hafirassou, M.L.; Zamborlini, A.; Cao-Lormeau, V.M.; et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 324–333, doi:10.1016/j.celrep.2016.12.045.
 169. Chang, H.R.; Munkhjargal, A.; Kim, M.-J.; Park, S.Y.; Jung, E.; Ryu, J.-H.; Yang, Y.; Lim, J.-S.; Kim, Y. The Functional Roles of PML Nuclear Bodies in Genome Maintenance. *Mutat. Res.* **2018**, *809*, 99–107, doi:10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002.
 170. Vrijheid, M. EThe Exposome: A New Paradigm to Study the Impact of Environment on Health. *Thorax* **2014**, *69*, 876–878, doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204949.
 171. Siroux, V.; Agier, L.; Slama, R. The Exposome Concept: A Challenge and a Potential Driver for Environmental Health Research. *Eur. Respir. Rev.* **2016**, *25*, 124–129, doi:10.1183/16000617.0034-2016.
 172. Suzuki, T.; Hidaka, T.; Kumagai, Y.; Yamamoto, M. Environmental Pollutants and the Immune Response. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 1486–1495, doi:10.1038/s41590-020-0802-6.
 173. Chen, J.; Liang, J.; Xu, H.; Liu, W.; Liu, S.; Duan, L.; Li, F.; Wang, Z.; Liu, Y.; McSharry, B.; et al. Targeting Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Enhances Type I Interferon-Independent Resistance to Herpes Simplex Virus. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, doi:10.1128/spectrum.00473-21.