



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas



Centro de  
Investigación en  
Dinámica Celular

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

**“Efecto de la inhibición de HMGB1 sobre la eficiencia de  
replicación del adenovirus humano tipo 5”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN CIENCIAS CON ÁREA  
TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PRESENTA:**

**YAZMIN UGALDE SANTIAGO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE  
CIDC, IICBA, UAEM**

**Miembros del comité tutorial:**

**Presidente Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla  
CIDC, IICBA, UAEM**

**Secretario Dr. Armando Hernández Mendoza  
CIDC, IICBA, UAEM**

**Vocal Dr. Ramón Antonio González García Conde  
CIDC, IICBA, UAEM**

**Suplente Dra. Sonia Dávila Ramos  
CIDC, IICBA, UAEM**

**Suplente Dra. Vanessa López Guerrero  
FAC. NUTRICIÓN, UAEM**

Esta tesis fue desarrollada en el grupo de virología molecular del Centro de Investigación en Dinámica Celular perteneciente al Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Ramón González García Conde, y con una beca CONACyT (A1-S-8696).

# Contenido

I Índice de figuras.....	4
II. Resumen .....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Adenovirus .....	6
1.1.1 Enfermedades.....	6
1.1.2 Clasificación.....	7
1.1.3 Estructura de la cápside.....	7
1.1.4 Organización del genoma y productos génicos.....	9
1.1.5 Ciclo de replicación de adenovirus.....	12
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 COMPARTIMENTOS DE REPLICACIÓN.....	16
2.1.1 Compartimentos de replicación de adenovirus.....	18
2.2 HMGB1.....	21
2.2.1 Estructura.....	22
2.2.2 Modificaciones post-traduccionales.....	23
2.2.3 Función .....	24
2.2.4 Relación HMGB1-virus.....	26
2.3 GLICIRRICINA.....	27
2.3.1 Actividad antiviral.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
6. METODOLOGÍA.....	31
6.1 Células y virus.....	31
6.2 Titulación por focos fluorescentes.....	32
6.3 Anticuerpos.....	32
6.4 Inmunofluorescencia.....	32
6.5 Glicirricina.....	33
6.6 Análisis de imágenes.....	34
6.7 Análisis por coeficiente de correlación de Pearson .....	35

<b>7. RESULTADOS</b> .....	35
<b>7.1 HMGB1 se localiza en dos distribuciones distintas en la célula.</b> .....	35
<b>7.2 La glicirricina disminuye el porcentaje de células en las que HMGB1 se localiza en RMI.</b> .....	37
<b>7.3 La infección de HAdV5 relocaliza a HMGB1.</b> .....	39
<b>7.4 La glicirricina afecta la formación de CR.</b> .....	44
<b>7.5 Análisis por coeficiente de correlación de Pearson</b> .....	49
<b>7.6 Producción de progenie viral</b> .....	50
<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	51
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	55
<b>11. REFERENCIAS.</b> .....	56
<b>12. ANEXOS.</b> .....	60

# I Índice de figuras

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Estructura de la cápside de adenovirus	8
<b>Figura 2</b>	Representación del genoma de adenovirus	9
<b>Figura 3</b>	Ciclo de replicación de adenovirus	12
<b>Figura 4</b>	Organización de DBP en los centros de replicación de adenovirus	19
<b>Figura 5</b>	Estructura de HMGB1	22
<b>Figura 6</b>	Modelo de interacción entre HMGB1 y H1	24
<b>Figura 7</b>	Diagrama de la metodología usada para los experimentos de localización de HMGB1 en los que se inhibió con glicirricina	33
<b>Figura 8</b>	Diagrama de la metodología usada para los experimentos de producción de progenie viral en tratamiento con glicirricina	34
<b>Figura 9</b>	Localización normal de HMGB1 en células HFF	36
<b>Figura 10</b>	Distribución de HMGB1 en células tratadas con glicirricina a diferentes tiempos	38
<b>Figura 11</b>	Localización de HMGB1 en células infectadas con HAdV5	41
<b>Figura 12</b>	Distribución de HMGB1 en células infectadas con HAdV5 y tratadas con glicirricina a diferentes tiempos post infección	45
<b>Figura 13</b>	Análisis de la colocalización de HMGB1 y DBP por coeficiente de correlación de Pearson	50
<b>Figura 14</b>	Cuantificación de la producción de progenie viral	51
<b>Figura A1</b>	Figura del anexo 1. Localización de HMGB1 en células infectadas con HAdV5.	60
<b>Figura A2</b>	Figura del anexo 2. Localización de HMGB1 en células infectadas con HAdV5 y tratadas con glicirricina	61

## II. Resumen

Los adenovirus son virus de DNA de doble cadena lineal que tienen la capacidad de infectar diferentes especies animales, entre ellos a los humanos, y causan enfermedades respiratorias o gastrointestinales. Su ciclo de replicación ocurre dentro del núcleo de la célula infectada, donde se forman inclusiones denominadas compartimentos de replicación (CR), que están compuestos de distintas proteínas virales y celulares, y es donde tiene lugar la replicación del genoma viral, la transcripción, y el procesamiento post-transcripcional de los mRNAs virales.

En el laboratorio de virología molecular se lograron aislar fracciones de estos compartimentos de replicación a partir de un protocolo modificado para el aislamiento de nucleolos. Con las fracciones aisladas se hicieron distintos experimentos, entre ellos su análisis proteómico, en el que se identificaron las proteínas celulares y virales que los componen. Una de las que más destacó fue la proteína HMGB1, ya que se encontró enriquecida en los CRs en comparación con el nucleoplasma.

HMGB1 es una proteína celular que se une directamente al DNA y que está implicada en varios procesos como la replicación del DNA, la transcripción, la recombinación, la reparación del DNA, y la regulación de la estructura de la cromatina. La proteína, tiene distintas funciones dependiendo de su localización, e incluso puede ser secretada y promover la inflamación. La glicirricina es un ácido que puede funcionar como inhibidor de HMGB1; es el principal componente activo de la raíz de regaliz y que tiene efecto antiviral contra influenza, SARS-CoV-2, VIH, entre otros.

El objetivo de este proyecto fue determinar si el reclutamiento de HMGB1 a los CRs es necesario para que el adenovirus humano tipo 5 se replique eficientemente; para ello se determinó su localización intracelular a distintos tiempos postinfección utilizando microscopía de inmunofluorescencia; además, se inhibió HMGB1 con glicirricina para determinar el efecto que esto tiene en su localización intracelular, y sobre la eficiencia de replicación del virus.

# **1. Introducción.**

## **1.1 Adenovirus**

Los adenovirus (AdV) son virus de DNA que se aislaron por primera vez en 1953 a partir de tejido adenoide (Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019). Son ubicuos (Hidalgo et al., 2016; King et al., 2016) y a pesar de ser agentes infecciosos en humanos, se han utilizado en biotecnología como vectores para el desarrollo de terapia génica y anticancerígena (Hidalgo et al., 2016), por ejemplo, en estudios hechos en China se encontró que la inoculación de un adenovirus humano (HAdV, por sus siglas en inglés) tipo 5 (HAdV-5) con delección del gen E1B, en pacientes con cáncer en combinación con quimioterapia, disminuyó el tamaño de tumores de cabeza y cuello (Flint et al., 2015). Los adenovirus también se han usado como vectores en el desarrollo de vacunas, ya que inducen una fuerte respuesta inmune innata y adaptativa (Hidalgo & González, 2022); entre ellas están las vacunas desarrolladas por la Universidad de Oxford con Aztra Zeneca, el Centro Médico Beth Israel Deaconess-Johnson and Johnson, CanSino Biologics, y la vacuna rusa Sputnik V contra el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV, por sus siglas en inglés) 2, causante de la pandemia por enfermedad de coronavirus 2019 (COVID-19) (Nakagami, 2021).

### **1.1.1 Enfermedades.**

Los AdV son patógenos humanos que causan enfermedades respiratorias (Hidalgo & González, 2022; Lynch et al., 2021; Tang et al., 2018), gastrointestinales, y queratoconjuntivitis; además se ha propuesto que están relacionados con la obesidad. Aunque normalmente no causan enfermedades severas en la población general adulta, en personas inmunocomprometidas pueden causar enfermedades más graves como la neumonía, e incluso la muerte (Hidalgo & González, 2022).

En niños causan aproximadamente un 7% de las enfermedades respiratorias agudas que se presentan a nivel mundial (Hidalgo & González, 2022; Tang et al., 2018), con un alto índice de morbilidad y mortalidad ya que no existe un tratamiento específico; además, los pacientes recuperados pueden tener secuelas. Parte de la enfermedad severa causada por la infección de HAdV se debe a que induce una

fuerte respuesta inmune en la que se sintetizan y secretan mediadores de la inflamación, que, aunque su rol principal es combatir la infección, cuando están en grandes cantidades dañan a las células normales e inducen necrosis (Tang et al., 2018).

Los adenovirus pueden inducir tumores en algunos animales, pero no en humanos (Hidalgo & González, 2022), sin embargo, se han utilizado como uno de los principales modelos de la virología tumoral (Hidalgo et al., 2016).

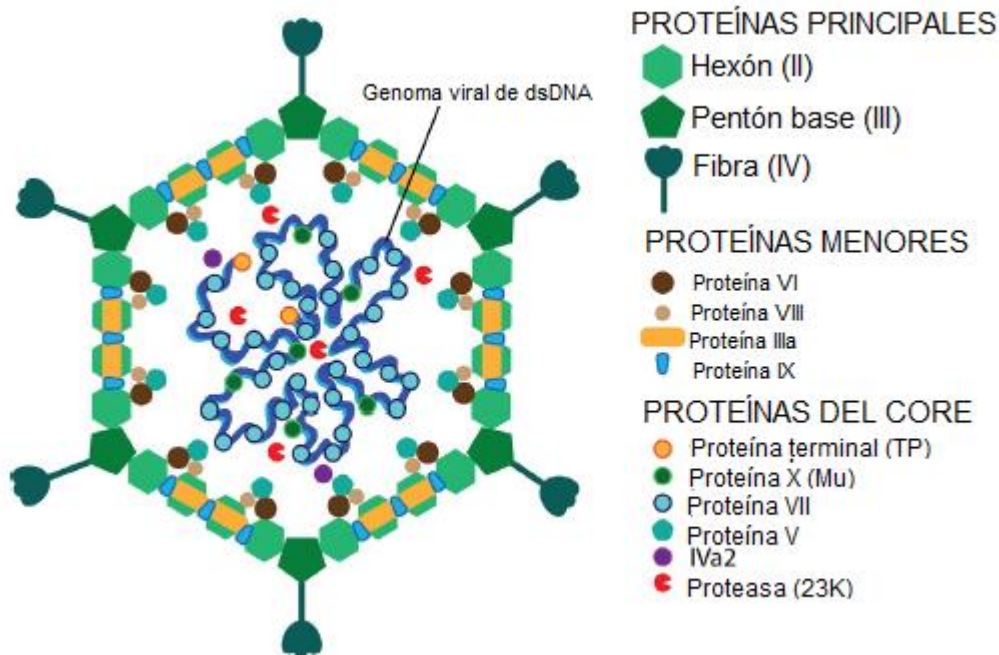
### **1.1.2 Clasificación.**

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae*, la cual comprende cinco géneros de virus que infectan a diferentes animales. El género *Mastadenovirus* está conformado por aquellos adenovirus que infectan mamíferos; de estos, 7 especies infectan humanos (Hidalgo & González, 2022; Tang et al., 2018) y son aproximadamente 103 tipos. Los HAdVs se nombran con una letra del alfabeto de la A a la G. Las especies B y C se asocian con enfermedades respiratorias (Tang et al., 2018), y HAdVC2 y HAdVC5 son los más estudiados (Hidalgo & González, 2022).

### **1.1.3 Estructura de la cápside.**

Los adenovirus son virus de doble cadena de DNA lineal (dsDNA, por sus siglas en inglés) que mide de 26 a 46 kb (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019). Son virus pequeños, no envueltos (King et al., 2016; Pied & Wodrich, 2019), de un diámetro aproximado de 900Å. La cápside (Figura 1) tiene forma icosaédrica y se conforma por 240 subunidades de la proteína hexón, que a su vez está formada por trímeros de la proteína II (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019), cuya estructura se compone de dos dominios de barriles  $\beta$  (Flint et al., 2015). La cápside tiene doce vértices formados de la proteína pentón base (Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019) (proteína III) y la proteína fibra (proteína IV) (Hidalgo & González, 2022).





**Figura 1.** Estructura de la cápside de adenovirus. Representación de la cápside de adenovirus y de las diferentes proteínas que la conforman. Modificada de **(Hidalgo & González, 2022)**.

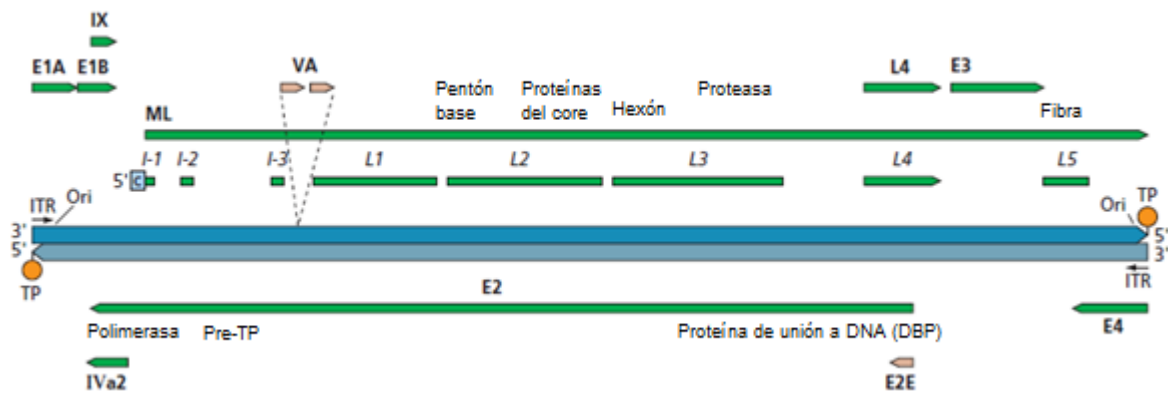
En el interior de la cápside se encuentran las proteínas menores IX, IIIa, VI y VII también representadas en la Figura 1 (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019). La proteína IX estabiliza la cápside, ya que al ser deletada las partículas virales son más susceptibles al calor (Flint et al., 2015). Se ha propuesto que la proteína VI conecta la cápside con la nucleocápside mediante su interacción con la proteína V (Pied & Wodrich, 2019). La nucleocápside está formada por el genoma y las proteínas V, VII, Mu y la proteína terminal (TP); esta última se encuentra unida covalentemente al DNA viral en sus extremos 5' y funciona como "primer" en la replicación del genoma viral (Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019). La proteína VII también se asocia directamente al DNA (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019), al igual que la proteína IVa2 (Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019). En la nucleocápside también se encuentra la proteasa viral cuyas funciones incluyen la maduración de precursores de las proteínas estructurales, y la liberación de la

cápside del endosoma cuando el virus entra en la célula huésped (Hidalgo & González, 2022).

### 1.1.4 Organización del genoma y productos génicos.

Como se describió anteriormente el genoma de AdV puede medir hasta 46 kb. Los extremos del DNA tienen secuencias de repeticiones invertidas terminales (ITRs por sus siglas en inglés) (Figura 2) que funcionan como orígenes de replicación (Hidalgo & González, 2022).

El genoma de los AdVs se divide en unidades transcripcionales (UT) (Figura 2) reguladas temporalmente. Las UTs tempranas son E1A, E1B, E2, E3, y E4, de las cuales E1A, E1B y E3 están en la cadena que se lee de izquierda a derecha, y los demás están codificados en la cadena complementaria. Las UTs tempranas retrasadas son IVa2, y IX localizadas en diferentes cadenas como se puede ver en la Figura 2. La UT tardía principal (ML, por sus siglas en inglés) está codificada en la misma cadena que los genes tempranos E1A, E1B, y E3. La expresión de las UTs tempranas retrasadas y de ML depende del inicio de la replicación del DNA. Por último, las UT VA I y II codifican dos RNAs pequeños transcritos por la RNA polimerasa III que se denominan RNAs asociados a virus, y son representados por flechas rosas en la Figura 2 (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022).



**Figura 2.** Representación del genoma de adenovirus. Las barras azules representan el dsDNA, unido en los extremos 5' a la proteína TP, las barras verdes representan las unidades transcripcionales y las flechas rosas representan los transcritos producidos por la RNA polimerasa III. Modificada de Flint et al., 2015.

La UT E1A codifica dos proteínas que se diferencian por la región conservada (CR, por sus siglas en inglés) 3 (CR3), cuyos mRNAs sufren splicing alternativo (Flint et al., 2015). Estas proteínas están implicadas en la regulación del ciclo celular y en la activación de la transcripción (Hidalgo & González, 2022); por ejemplo, activan la transcripción de las UTs E2, E3, y E4 (Pied & Wodrich, 2019). La estructura de la región CR3 forma un motivo dedo de zinc que estimula la transcripción de los genes tempranos de AdV al unirse a activadores celulares como el factor de ADP-ribosilación 4 (Arf-2), el factor de transcripción Sp1, y la subunidad 23 del mediador de la transcripción de la RNA polimerasa II (Med23), que promueven el ensamblaje del complejo de preiniciación y del complejo de elongación en los promotores virales, y posteriormente la transcripción de los genes virales (Flint et al., 2015). Además E1A interacciona con factores de transcripción, y remodeladores de la cromatina (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022), como la acetiltransferasa de histonas p300, y la proteína de unión a Creb (Crebbp) (Flint et al., 2015), que inducen la expresión de genes necesarios para la entrada a fase S de la célula huésped (Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019). Las proteínas E1A también regulan la entrada de la célula a la fase S del ciclo celular al interactuar con la proteína asociada a retinoblastoma (Rb). Rb reprime la transcripción de genes blanco de E2f, que están involucrados en la progresión del ciclo celular y de la replicación del DNA. Entonces, la unión de E1A a través de las regiones CR1 y CR2 a Rb impide su unión a E2f, lo que lleva a la transcripción de sus genes blanco (Flint et al., 2015; Schmid et al., 2014).

Las proteínas codificadas en la UT E1B y E3 inhiben mecanismos de la respuesta antiviral, tanto celular, como la del sistema inmune; por ejemplo, al inhibir el reconocimiento de las células infectadas y su eliminación por células del sistema inmune adaptativo (Hidalgo & González, 2022).

Un aspecto interesante es que tanto E1A como E1B promueven la transformación celular y anulan la regulación del ciclo celular (Lynch et al., 2021).

Las proteínas que son sintetizadas a partir de los transcritos de la UT E2 están involucradas directamente en la replicación del genoma viral, estas son: la DNA

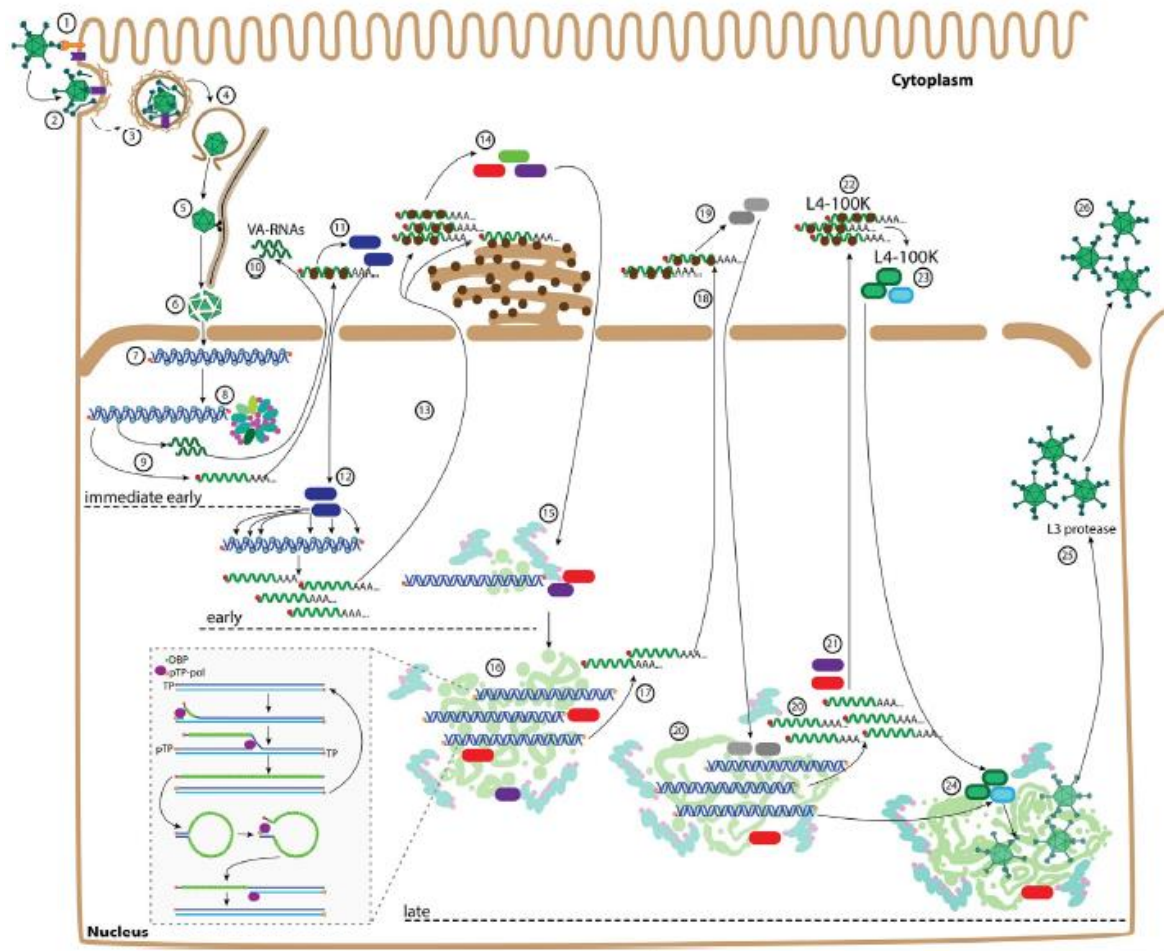
polimerasa viral (pol), el precursor de la proteína terminal (pTP), y la proteína de unión a ssDNA (DBP por sus siglas en inglés) (Hidalgo & González, 2022).

La UT E4 codifica proteínas que participan en procesos muy diferentes, por ejemplo, la traducción y su regulación; el splicing; la exportación selectiva de mRNAs virales; la replicación del DNA viral; y la apoptosis. Las proteínas E4 se nombran de acuerdo con el marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés) a partir del cual se transcribe su mRNA (Hidalgo & González, 2022).

En general los virus encapsidan su genoma con proteínas básicas, ya sea celulares o virales; en el caso de adenovirus, codifica la proteína básica pequeña VII, que aparte de su función en la organización del genoma viral dentro de la cápside, también está involucrada en la remodelación de la cromatina celular inducida por la infección de AdV. Esta proteína se localiza en los centros de replicación, que se describen más adelante, en el citoplasma, y en el espacio extracelular (Avgousti et al., 2016), pero sus funciones en citoplasma y fuera de la célula se desconocen. La proteína IVa2 funciona como un factor de transcripción para promotores virales tardíos, y también está involucrada en el empaquetamiento del genoma viral (Hidalgo & González, 2022).

Las proteínas estructurales están codificadas en la UT ML que tiene dos promotores, L4P regula la expresión de las proteínas L4-22K, y L4-33K, que, junto con IVa2 y IX activan al otro promotor de ML, MLP. MLP regula la expresión de L1-52/55K en la etapa temprana del ciclo de replicación viral. Mientras que en la fase tardía se producen los demás mRNAs codificados en L1, L2, L3, L4, y L5, que se definen por el sitio de poliadenilación, y posteriormente sufren splicing alternativo y generan alrededor de 20 mRNAs diferentes (Hidalgo & González, 2022).

### 1.1.5 Ciclo de replicación de adenovirus.



**Figura 3.** Ciclo de replicación de adenovirus. 1) Unión de la proteína fibra con el receptor celular. 2) Interacción de proteína pentón base con el correceptor e inicio de la endocitosis. 3) Partícula viral endocitada y parcialmente desensamblada. 4) Liberación del endosoma. 5) Transporte de la cápside a través de los microtúbulos. 6) Desensamblaje de la cápside en el CPN. 7) Importación del genoma viral al núcleo. 8) Localización del genoma viral cerca de los cuerpos de PML. 9) Transcripción de VA-RNAs. 10) Exportación de VA-RNAs al citoplasma. 11) Exportación a citoplasma de mRNA de E1A. 12) Translocación al núcleo de proteína E1A y activación de la transcripción de genes tempranos. 13) Exportación de mRNAs tempranos. 14) Traducción de mRNAs tempranos. 15) Importación de proteínas tempranas que remodelan el núcleo. 16) Formación de compartimentos de replicación y síntesis de DNA viral. 17) Activación del promotor de L4. 18) Exportación de mRNAs de L4 22K, y L4 33K. 19) Traducción de mRNAs L4 22K y 33K. 20) Activación de la expresión de genes virales

tardíos. 21) Exportación selectiva de transcritos virales tardíos. 22) Traducción de transcritos tardíos facilitada por L4-100K. 23) Proteínas tardías. 24) Importación de proteínas virales tardías al núcleo y ensamblaje de las partículas virales. 25) Maduración de partículas virales. 26) Liberación de progenie viral por lisis celular. Tomada de Hidalgo & González, 2022.

El ciclo de replicación de adenovirus está dividido en dos fases, la temprana, y la tardía (Hidalgo & González, 2022). La fase temprana inicia con el reconocimiento entre la célula huésped y la partícula viral mediante la unión de la proteína fibra con el receptor (Flint et al., 2015; Pied & Wodrich, 2019) de coxsackie y adenovirus (CAR, por sus siglas en inglés) (Figura 3, 1); posteriormente la proteína pentón base interacciona con integrinas,  $\alpha_v\beta_3$  o  $\alpha_v\beta_5$  (Figura 3, 2) (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019), por medio de una secuencia de aminoácidos que imita a sus ligandos normales; la partícula es internalizada por endocitosis mediada por clatrina (Figura 3, 3) (Flint et al., 2015).

Dentro del endosoma se terminan de desensamblar las proteínas fibra de la cápside (Figura 3, 2-3), posteriormente el endosoma se acidifica (Flint et al., 2015) promoviendo la activación de la proteasa viral, que corta a las proteínas pentón base, Ila, y hexón, lo que desestabiliza la cápside viral y a su vez promueve la liberación de la proteína VI (Hidalgo & González, 2022). La región N-terminal de la proteína VI es hidrofóbica (Flint et al., 2015), por lo cual puede desestabilizar la membrana del endosoma y liberar la partícula viral al citoplasma (Figura 3, 4) (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022). Posteriormente, la interacción de la proteína hexón con dineína permite que el resto de la cápside sea transportada hasta el complejo del poro nuclear (CPN) a través de los microtúbulos (Figura 3, 5) (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022; Schmid et al., 2014). En el CPN los restos de la cápside se anclan a la nucleoporina Nup214 (Flint et al., 2015; Pied & Wodrich, 2019), y a la cinesina-1; la primera mantiene la cápside unida al CPN, y la segunda la transporta hacia el polo positivo de los microtúbulos (Flint et al., 2015), esto provoca el completo desensamblaje de la cápside (Figura 3, 6). Entonces, el DNA viral asociado con algunas proteínas virales, como la proteína VII, es

translocado dentro del núcleo (Figura 3, 7) (Flint et al., 2015; Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019; Schmid et al., 2014).

Al entrar en el núcleo el genoma viral se localiza en sitios adyacentes a los cuerpos nucleares de la proteína de la leucemia promielolítica (PML) (Figura 3, 8), donde algunos de sus componentes como la proteína VI asociada al dominio de muerte (DAXX) reprimen la transcripción del DNA viral. Sin embargo, los adenovirus han evolucionado estrategias para superar esta represión, ya que la proteína VI que acompaña al genoma cuando es translocado al núcleo contrarresta la represión. En etapas posteriores del ciclo de replicación viral la proteína E1B-55K marca a DAXX para su degradación en proteasoma. Además, los cuerpos de PML son reorganizados en la infección con AdV. La proteína temprana E4orf3 induce la reorganización de los cuerpos de PML de estructuras esféricas a estructuras filamentosas; además, la infección induce la relocalización de varios de sus componentes, como PML, Sp100, DAXX, SUMO-1, y TIF1 $\alpha$  a los compartimentos de replicación (CR) virales, estructuras que se describirán más adelante (Schmid et al., 2014). Además la infección de AdV altera la respuesta celular de daño al DNA (DDR, por sus siglas en inglés) por medio de los productos de los genes tempranos E1 y E4 (Hidalgo & Gonzalez, 2019).

Los genes virales tempranos son encargados de activar y regular procesos que permiten un óptimo desarrollo del ciclo de replicación viral; por ejemplo, la inducción de la entrada de la célula huésped en fase S, con la consecuente síntesis de aminoácidos y nucleótidos que son utilizados para la replicación del DNA, la transcripción y la traducción virales. Además, los genes virales tempranos también están involucrados en la inhibición de mecanismos antivirales de la célula, como la respuesta inmune o la apoptosis, entre otros (Hidalgo & González, 2022).

La fase tardía del ciclo de replicación de AdV está delimitada por el inicio de la replicación del genoma (Figura 3, 16), que ocurre por un mecanismo de desplazamiento de cadena, donde los ITRs funcionan como orígenes de replicación, y la proteína DBP estabiliza la cadena sencilla que es desplazada mientras la nueva cadena es sintetizada por la DNA polimerasa viral (Hidalgo & González, 2022).

Al acumularse nuevos genomas sintetizados se promueve la transcripción de los genes tardíos (Figura 3, 17), así como de la producción de progenie viral; procesos que toman lugar en los CRs y adyacentes a estos, respectivamente (Hidalgo et al., 2016). Las proteínas IX y IVa2 se sintetizan con la acumulación del DNA viral. Cuando el promotor L4P es activado promueve la expresión de L4 22K y 33K, que a su vez, promueven la transcripción de L2, L3, L4 y L5 (Hidalgo & González, 2022). La formación de un complejo entre las proteínas virales E1B-55K y E4orf6 (Pied & Wodrich, 2019) media la exportación de transcritos virales tardíos al citoplasma con preferencia sobre la exportación de mRNAs celulares (Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019), y aunque no se sabe el mecanismo exacto, se ha propuesto que el complejo E3 ubiquitin ligasa marca a proteínas celulares involucradas en la exportación de los transcritos celulares para su degradación en el proteasoma (Schmid et al., 2014). También se ha propuesto que TAP/NXF1 está involucrado en este proceso (Pied & Wodrich, 2019; Schmid et al., 2014), o que diferentes factores de exportación celulares son relocalizados a los CRs y que promueven la exportación preferencial de transcritos virales (Schmid et al., 2014). La traducción de mRNAs virales tardíos también tiene preferencia, a través de un mecanismo de “ribosome shunting” (Hidalgo & González, 2022).

Las proteínas estructurales son importadas al núcleo, se acumulan y ensamblan las cápsides (Figura 3, 24) (Hidalgo & González, 2022; Pied & Wodrich, 2019). El mecanismo por el cual se empaqueta el genoma no está bien establecido; sin embargo, existen estudios que han mostrado que L1 52/55K podría mediar el empaquetamiento concomitantemente con la formación de la cápside al asociarse con IVa2 y L4-22K. Las partículas virales no son infecciosas en ese punto, y maduran por acción de la proteasa viral (Figura 3, 25). Por último la proteína E3-11.6K regula la liberación de AdV por lisis celular (Pied & Wodrich, 2019), y se ha estimado que la producción de progenie viral es de entre 10 a 100,000 partículas por célula (Hidalgo & González, 2022).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 COMPARTIMENTOS DE REPLICACIÓN.

Los compartimentos de replicación (CR), llamados también fábricas virales, viroplasmos o centros de replicación (Hidalgo et al., 2016), son estructuras intracelulares compuestas de moléculas virales y celulares (Hidalgo et al., 2016; Schmid et al., 2014), inducidas por la infección de todos los virus en los que se han estudiado. Se forman en el citoplasma o el núcleo (Schmid et al., 2014) y representan una estrategia común en muchos virus (Hidalgo et al., 2016) ya que en estas estructuras ocurre la replicación del genoma viral y la expresión de los genes virales (Schmid et al., 2014). Además, estas estructuras protegen a las moléculas virales del reconocimiento de la respuesta antiviral de la célula huésped (Hidalgo et al., 2016).

Virus tanto de RNA como de DNA inducen la formación de estas estructuras, sin embargo, tienen características particulares. Los virus de RNA<sup>+</sup> forman CRs asociados a membranas simples o dobles. Los virus de DNA que se replican en citoplasma, como los virus de DNA grandes nucleocitoplásmicos, como los de las familias *Poxviridae* y *Asfarviridae*, también forman CRs asociados a membranas, e inducen la reorganización de organelos como el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, la mitocondria, el endosoma, o el lisosoma, e inducen cambios en el citoesqueleto (Schmid et al., 2014).

Por el contrario, los virus de DNA que se replican en el núcleo no forman CR asociados a membranas, aunque sí inducen la reorganización de componentes del núcleo como la cromatina, y dominios nucleares como los cuerpos de PML, los cuerpos de Cajal (CB, por sus siglas en inglés), los gránulos de intercromatina (GI), y/o el nucleolo (Charman & Weitzman, 2020; Hidalgo et al., 2016; Schmid et al., 2014).

La formación de CRs tiene características particulares dependiendo del virus, pero en general comparten algunas, como el reclutamiento y/o control de factores celulares involucrados en procesos como la replicación del genoma y la transcripción, la evasión de los mecanismos de defensa antiviral de la célula

(Charman & Weitzman, 2020; Schmid et al., 2014) y el secuestro de vías de señalización, o vías metabólicas (Schmid et al., 2014).

La cantidad de CR en el núcleo varía dependiendo del virus, las condiciones del cultivo, el tipo celular infectado, la multiplicidad de infección (MOI) utilizada, etc. Pero, en general, los virus de DNA pueden formar de 1 hasta 20 CRs por núcleo (Charman & Weitzman, 2020) y su localización suele ser cercana a los cuerpos de PML (Charman & Weitzman, 2020; Schmid et al., 2014). Además la formación de los CRs implica el reclutamiento de proteínas que promueven la replicación viral (Schmid et al., 2014), como la DNA polimerasa, la RNA polimerasa, factores de transcripción, y de procesamiento post-transcripcional, entre otros (Hidalgo et al., 2016; Schmid et al., 2014); además de componentes que participan en la respuesta antiviral celular como PML, p53, ATM, ATR, DAXX, y STAT (Schmid et al., 2014).

Los CRs inducidos por la familia *Herpesviridae* se forman cerca de los cuerpos de PML y cooptan algunos de sus componentes. La proteína 0 de célula infectada (ICP0) del virus del Herpes Simple 1 (VHS-1) actúa como una ubiquitina ligasa y etiqueta a PML y Sp100 para su degradación en proteasoma (Charman & Weitzman, 2020; Schmid et al., 2014), lo que impide que la respuesta celular antiviral bloquee la replicación del virus (Schmid et al., 2014). Un aspecto interesante del ciclo de replicación de VHS-1 es que induce la formación de agregados llamados dominios enriquecidos de chaperonas inducidos por virus (VICE por sus siglas en inglés), en los cuales se encuentran distintas proteínas chaperonas, cuya función en el ciclo de replicación del virus es el correcto ensamblaje y plegamiento de las proteínas y complejos necesarios para la replicación viral (Schmid et al., 2014).

Otros miembros de la familia *Herpesviridae* que también disrumen los cuerpos de PML son: el virus de la varicela zoster (VVZ) (Charman & Weitzman, 2020), el citomegalovirus humano (HCMV) (Charman & Weitzman, 2020; Schmid et al., 2014), el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV, por sus siglas en inglés), el virus de Epstein-Barr (VEB) (Charman & Weitzman, 2020; Schmid et al., 2014), y el herpesvirus saimirí (HVS, por sus siglas en inglés) (Schmid et al., 2014).

Los virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) roban los CRs de otros virus (como AdV), donde ocurre su ciclo de replicación a excepción del ensamblaje de la progenie viral, que ocurre en el nucleolo (Schmid et al., 2014).

Los parvovirus autónomos también se replican en el núcleo y forman CR en los que se encuentran proteínas celulares como PCNA, RPA, RFC, y las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\gamma$ . Estas estructuras llegan a ser tan grandes en etapas tardías de la replicación que ocupan casi todo el núcleo de la célula huésped (Schmid et al., 2014).

El papilomavirus de bovino 1 (VPB1) y los tipos 16 y 18 del papilomavirus humano (VPH) requieren de PML para poder llevar a cabo infecciones productivas, ya que esta proteína está implicada en la transcripción de los genes virales (Charman & Weitzman, 2020).

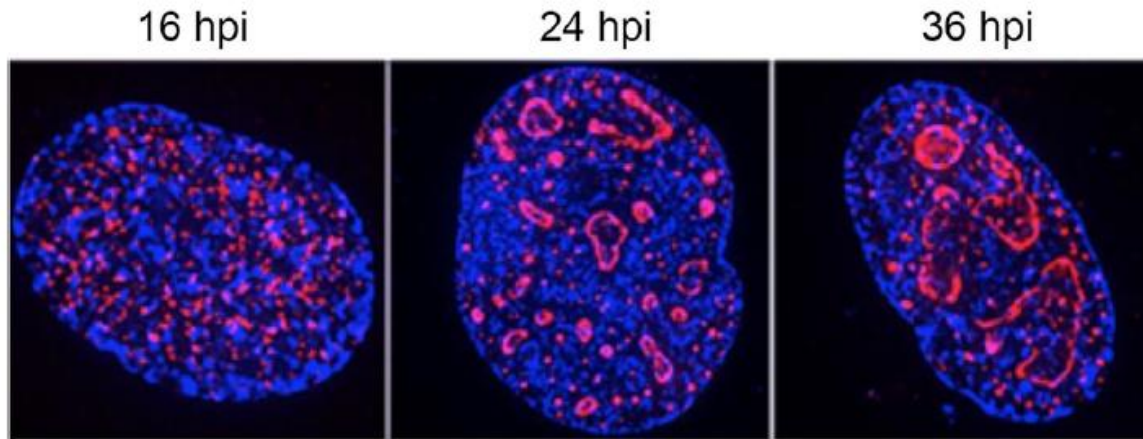
Los CRs de muchos virus de DNA nucleares, incluyendo los de AdV, los cuerpos de Negri inducidos por el virus de la rabia, y los CRs del virus de la estomatitis vesicular están formados por separación de fases líquido-líquido (LLPS, por sus siglas en inglés). Los componentes de los LLPS incluyen ácidos nucleicos y proteínas, muchas de estas con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs, por sus siglas en inglés). Las proteínas DBP y E1B-55K de AdV tienen IDRs y forman parte de los CRs. Una característica de las estructuras formadas por LLPS es que pueden intercambiar componentes rápida y dinámicamente con el exterior ya que carecen de membranas, además estas estructuras pueden fusionarse y hacerse más grandes (Hidalgo & Gonzalez, 2019).

### **2.1.1 Compartimentos de replicación de adenovirus.**

Los CRs de AdV (AdCR) se describieron por primera vez como “inclusiones virales electrodensas”, y fueron vistos usando microscopía electrónica de transmisión (Hidalgo & Gonzalez, 2019). Estudios más recientes en los que se ha utilizado la proteína DBP como marcador, han revelado que tienen una morfología dinámica que cambia conforme avanza el ciclo de replicación (Figura 4) (Hidalgo et al., 2016; Hidalgo & Gonzalez, 2019).

Aunque no se conoce bien el mecanismo por el cual se establecen los CRs de AdV, se ha propuesto que el genoma viral al entrar al núcleo induce su formación, ya que

en la expresión de genes virales tempranos participan proteínas celulares unidas en los promotores virales (Hidalgo & Gonzalez, 2019).



**Figura 4.** Organización de DBP en los centros de replicación de adenovirus. Microscopía TIRF de DBP que es utilizado como marcador de los CRs de AdV. La morfología de los CRs cambia a lo largo del ciclo de replicación del virus, localizándose en puntos en tiempos tempranos (16 hpi); en anillos al final de la replicación del DNA (24 hpi); y en estructuras más grandes en tiempos tardíos de la infección (36 hpi). Tomada de Hidalgo & Gonzalez, 2019.

Al entrar al núcleo la proteína VII que se encuentra asociada con el genoma impide que sea reconocido por componentes de DDR, mientras tanto la proteína Terminal interactúa con la matriz nuclear y con el complejo carnamil fosfato sintetasa aspartato transcarbamilasa y deshidrogenasa (CAD) (Hidalgo & Gonzalez, 2019), interacciones que son necesarias para el inicio de la transcripción de los genes virales. Alrededor de 4 hpi el genoma viral se localiza adyacente a los cuerpos de PML, que como se describió anteriormente, sufren una reorganización tanto de su morfología como de algunos de sus componentes, mediada por las proteínas E4orf3 y E4orf6 (Charman & Weitzman, 2020; Hidalgo & Gonzalez, 2019). Los CRs tempranos se distribuyen en focos (Figura 4), y antes de que comience la replicación del genoma viral la morfología de los RCs cambia a una forma de anillo (Figura 4); en tiempos tardíos (36 hpi) existen tanto focos pequeños como anillos grandes y con morfología compleja, con DBP distribuida en la periferia de los CRs en donde

ocurre la síntesis de DNA viral (Figura 4) (Hidalgo et al., 2016; Hidalgo & Gonzalez, 2019).

Entre las proteínas virales que se han identificado en los AdCRs se encuentran DBP, Pol, pTP, E1B-55K, E4Orf6, E4Orf4, L4-22K, L4-33K, mientras que, de las proteínas celulares existen al menos 80 que están implicadas en la regulación de la replicación del DNA y de la transcripción, la organización de la cromatina, DDR, el citoesqueleto, la respuesta inmune innata, el procesamiento postranscripcional y la exportación de mRNAs. Varias de las proteínas celulares encontradas en los CRs son componentes de diferentes cuerpos nucleares que han sido cooptadas (Hidalgo & Gonzalez, 2019).

Por medio de microscopía se encontró que la organización de los CRs se compone de distintas regiones. Los sitios de acumulación del ssDNA, son regiones fibrilares que, aparte de contener ssDNA, contienen DBP. La Zona Replicativa Periférica (ZRP) es una red fibro-granular que contiene dsDNA, componentes del spliceosoma, mRNAs poli (A), IVa2, L1 52/55K, y poca DBP (Hidalgo & Gonzalez, 2019), y es el sitio en donde ocurre la replicación del DNA viral y la transcripción (Hidalgo et al., 2016; Hidalgo & Gonzalez, 2019). En el centro de los CRs se localiza la región grande y densa llamada “sitios de almacenamiento de genoma”, en la que se acumula el dsDNA que no está siendo transcrito o replicado. Los anillos compactos contienen RNA-VA, y proteína IVa2, y se encuentran cerca de los GI, que contienen snRNP, factores de splicing, rRNA, pre-mRNAs virales y mRNAs con colas de poli(A). También existe una región denominada “cuerpos pIX” que tiene altos niveles de la proteína pIX, y se forma en la fase tardía de la infección, contiene IFN, PML, Sp100, PKR, y CK2 $\alpha$ , pero su función se desconoce. Por último, la región denominada como “cristales de proteínas” se forma al final del ciclo de replicación y contiene proteínas virales estructurales, como la proteína fibra, y la proteína pentón base en arreglos paracristalinos (Hidalgo & Gonzalez, 2019)

Se ha propuesto que la replicación del genoma y la transcripción ocurren en la periferia de los CR ya que ahí se localizan varios componentes de los GI y de los CB, así como moléculas que participan en el procesamiento post-transcripcional de los mRNAs virales (Hidalgo & Gonzalez, 2019).

En 2016 Hidalgo et al., lograron aislar fracciones de los CR de AdV mediante un protocolo de fraccionamiento basado en el aislamiento de los nucleolos, que utiliza sacarosa, magnesio y sonicación suave. Con diferentes experimentos mostraron que las fracciones aisladas eran funcionales ya que en ellas puede ocurrir la síntesis de DNA y RNA viral *de novo*, así como el splicing de mRNAs tardíos virales (Hidalgo et al., 2016). Además, se hizo un análisis proteómico de estas fracciones (datos no publicados), en el que se encontró que, entre las proteínas celulares que estaban más enriquecidas dentro de los CRs en comparación con el nucleoplasma, está la proteína del grupo de alta movilidad box 1 (HMGB1, por sus siglas en inglés). Dado que la replicación del DNA viral, la transcripción, y el procesamiento postranscripcional ocurren en los AdVCRs y que se desconoce la función de muchos de sus componentes, en especial de las proteínas celulares cooptadas a estas estructuras, resulta interesante investigar el papel que podrían tener en la biología del virus.

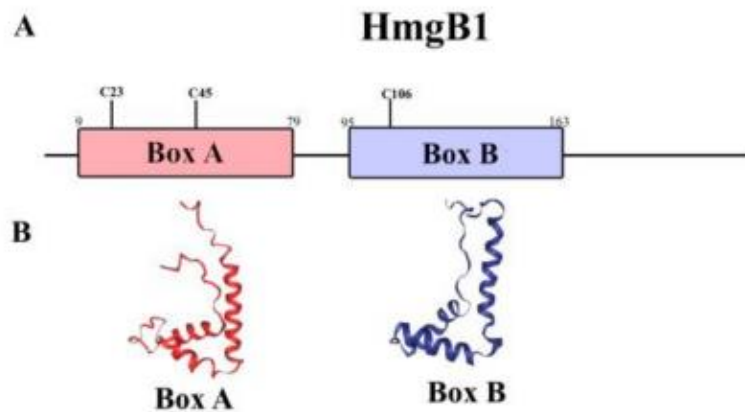
## **2.2 HMGB1.**

Las proteínas de la familia del grupo de alta movilidad (HMG por sus siglas en inglés) son proteínas heterogéneas que se unen a DNA pero no son histonas. Existen tres familias, HMGA, HMGN, y HMGB, que tienen distintas funciones en la cromatina, como la replicación del DNA celular, la expresión de genes y la estructura de la cromatina. La familia más estudiada es la HMGB, donde la B hace referencia a un dominio conservado de estas proteínas, denominado Box en inglés (caja en español). Este dominio está formado por 80 aminoácidos, entre los cuales destacan una serie de aminoácidos hidrofóbicos que definen su organización espacial. En esta familia existen 4 miembros HMGB1-4, que tienen uno o más de estos dominios. No tienen una secuencia de unión específica al DNA, pero en general son secuencias ricas en ATs, y tienen alta afinidad por regiones de DNA con anomalías estructurales como doblamientos, torceduras, entrecruzamientos, o superenrollamientos. Los miembros más conocidos son HMGB1 y HMGB2 (Chikhirzhina et al., 2020).

HMGB1 es una proteína nuclear no histona de alrededor de 30kDa, presente sobre todo en células linfoides, cerebrales, hepáticas, renales, pulmonares, cardíacas y

del bazo (Tang et al., 2018). Participa en distintos procesos como la replicación y recombinación del DNA (Chikhirzhina et al., 2020; Tang et al., 2018), la regulación de la transcripción, la reparación del DNA, el metabolismo, el arresto del ciclo celular, la senescencia, autofagia y apoptosis (Chikhirzhina et al., 2020), la estabilidad de nucleosomas, la regulación de hormonas esteroides, y la diferenciación celular (Tang et al., 2018). Se ha estimado que existe alrededor de 1 molécula de HMGB1 por cada 10-15 nucleosomas en el núcleo de una célula (Chikhirzhina et al., 2020).

### 2.2.1 Estructura



**Figura 5.** Estructura de HMGB1. A) representación de la estructura de HMGB1. B) Estructura secundaria de los dominios A y B de HMGB1 en 3D (Chikhirzhina et al., 2020).

La proteína HMGB1 tiene dos dominios de unión a DNA, nombrados A y B. El carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína contiene una gran cantidad de Asp y Glu. El 80% de su estructura está conformada por alfa hélices, tres en cada dominio, y forman una estructura en forma de L. Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos entre las hélices I y II estabilizan su orientación espacial, y tres prolinas en la región amino terminal (N-terminal) de la hélice III también participan en su estabilización. HMGB1 tiene dos conformaciones, llamadas colapsada y expandida. En la conformación colapsada se encuentra inactiva y el C-terminal de la proteína se localiza entre los dominios de unión a DNA (A y B) e interacciona con varios aminoácidos básicos; en la conformación expandida se disrumen estas

interacciones y la proteína se activa. Este cambio puede ocurrir por modificaciones post-traduccionales. HMGB1 cuenta con dos señales de localización nuclear (SLN), dos de exportación nuclear (SEN), y una cola ácida C-terminal que media su interacción con el DNA (Chikhirzhina et al., 2020).

### **2.2.2 Modificaciones post-traduccionales**

HMGB1 puede sufrir modificaciones post-traduccionales como la acetilación, metilación, fosforilación, glicosilación y ADP-ribosilación, las cuales están implicadas principalmente en su localización intra y extracelular, y en su interacción con otras moléculas (Mollica et al., 2007).

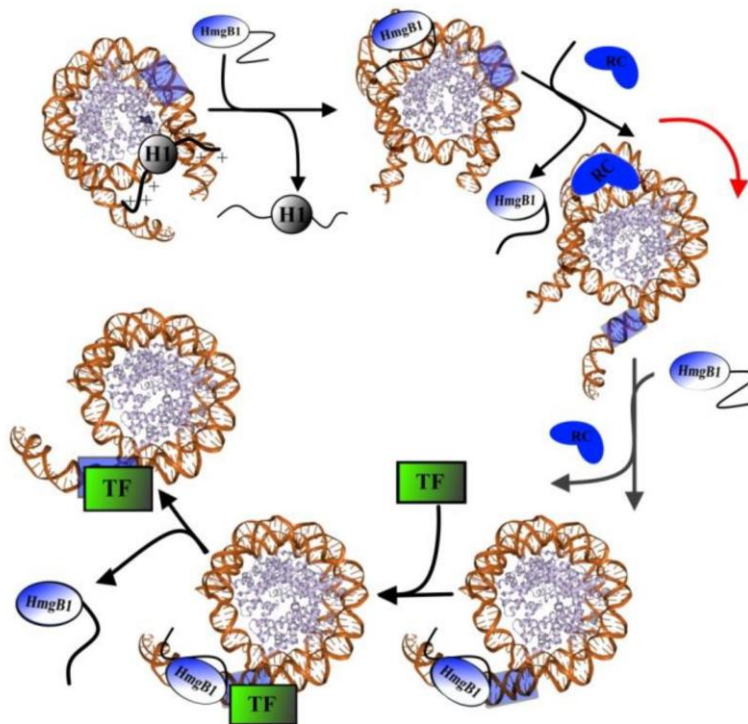
HMGB1 tiene seis residuos de serina cerca de SLN que pueden ser fosforilados, y median la interacción DNA-HMGB1 (Mollica et al., 2007). Aparte de estar involucrada en la localización de HMGB1, la acetilación también juega un papel en la unión de la proteína al DNA, y en su secreción extracelular. HMGB1 tiene dos residuos de lisina en la región N-terminal que al ser acetiladas median su unión al DNA. En macrófagos en reposo se encontró que la hiperacetilación de HMGB1 está implicada en su translocación del núcleo al citoplasma, y en neutrófilos se encontró que la metilación de la Lys-42 promueve la exportación de HMGB1 al citoplasma. HMGB1 puede ser N-glicosilada en Asn-37, Asn-134 o Asn-135; esta modificación está implicada en la exportación de la proteína al citoplasma ya que media la interacción de HMGB1 con la exportina CRM1 (exportina 1). La N-glicosilación de HMGB1 es mediada por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), tricostatina A (TSA), y lipopolisacárido (LPS). Por último la ADP-ribosilación de HMGB1 está implicada en su liberación por células necróticas así como en la translocación del núcleo al citoplasma (Chikhirzhina et al., 2020).

Además de las modificaciones post-traduccionales, el estado redox de HMGB1 está implicado en su localización y función. En el núcleo las Cys 23, 45 y 106 se encuentran reducidas. En el citoplasma los residuos de Cys 23 y 45 son oxidados y forman un puente disulfuro, esta oxidación está relacionada con la secreción de HMGB1 y su función como una molécula de señalización para activar las vías de señalización MAPK1, NF- $\kappa$ B y fosfoinositol 3-cinasa/AKT, o para regular migración celular y respuesta inmune (Chikhirzhina et al., 2020).



### 2.2.3 Función

En el núcleo HMGB1 interacciona con el surco menor del DNA en regiones internucleosomales; se ha propuesto que la unión es principalmente a través del dominio B, pero hay otros autores que sostienen que involucra a ambos dominios. Su unión promueve un doblamiento de hasta  $140^\circ$  en el DNA que permite la unión de otras proteínas como factores de transcripción y remodeladores de la cromatina (Chikhirzhina et al., 2020).



**Figura 6.** Modelo de interacción entre HMGB1 y H1. La unión de HMGB1 a H1 desplaza del DNA a la histona. El complejo de remodelación es reclutado y el nucleosoma se desplaza exponiendo ciertas regiones del DNA para la unión de factores de transcripción. El recuadro azul representa los promotores, el recuadro verde a factores de transcripción, y el ovalo azul representa a HMGB1. Figura tomada de Chikhirzhina et al., 2020.

HMGB1 interacciona con distintas proteínas; entre ellas histonas, que son pequeñas proteínas básicas que compactan al DNA (King et al., 2016). Un ejemplo de esta interacción es la histona H1. HMGB1 y H1 tienen funciones contrarias ya que H1

está implicada en la compactación de la cromatina, y HMGB1 en la descompactación (Lynch et al., 2021). Por medio de su N-terminal básico H1 se une al C-terminal negativo de HMGB1 (Figura 6). Esta interacción promueve la disociación de H1 del DNA que se vuelve accesible a otras proteínas, como el complejo remodelador de la cromatina, que desplaza a los nucleosomas y expone regiones como promotores a los que se reclutan factores de transcripción para su unión directa al DNA o a través de HMGB1 (Chikhirzhina et al., 2020).

HMGB1 está involucrada en la formación del complejo de reparación del mismatch (MMR, por sus siglas en inglés), e interacciona con Hsp70, MSH2 y MLH1. También participa en la reparación de la escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés), y la reparación de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés). Además, estimula la actividad de la proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-Pkcs), RAG1, RAG 2, la T4-DNA ligasa, y el supresor tumoral p53. Sin embargo, inhibe la reparación del DNA al interactuar con aductos de cisplatino (Chikhirzhina et al., 2020).

Una característica interesante de HMGB1, es que a pesar de ser una proteína de unión a DNA, puede ser secretada (Avgousti et al., 2016; Chikhirzhina et al., 2020) pasivamente por células necróticas, o activamente por células del sistema inmune (Chikhirzhina et al., 2020; King et al., 2016; Mollica et al., 2007) como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, células dendríticas, y células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés). Su secreción es independientemente del aparato de Golgi o el RE (Mollica et al., 2007). Extracelularmente funciona como una alarmina que promueve la expresión de citocinas proinflamatorias (Avgousti et al., 2016; Chikhirzhina et al., 2020; King et al., 2016; Mollica et al., 2007) y señala la infección o el daño celular (Avgousti et al., 2016).

Cuando HMGB1 es secretada puede interactuar con receptores tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés), específicamente TLR2, TLR4 y TLR9, así como con receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE), donde señala la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Chikhirzhina et al., 2020; Tang et al., 2018), lo que ocurre en monocitos, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales (Tang et al., 2018), y conduce a la activación de NF- $\kappa$ B que activa la transcripción de citocinas pro-inflamatorias (Chikhirzhina et al., 2020; Tang et al.,

2018). La interacción RAGE-HMGB1 también estimula la producción del ligando de quimiosina con motivo CXC (CXCL) 12 que al unirse con el receptor de quimiosina tipo 4 (CXCR4) activa migración celular, proliferación, y diferenciación. Por otro lado, cuando interacciona con TLR2 activa células NK, y contrario a su rol como alarmina, su interacción con CD24 regula negativamente a NF- $\kappa$ B, lo que lleva a una disminución de la inflamación (Chikhirzhina et al., 2020).

Aunque el papel de HMGB1 en las mitocondrias aún no está bien establecido, se sabe que su delección provoca que las mitocondrias tengan una morfología corta y redondeada que impide que sean funcionales. Por otro lado su delección también induce senescencia prematura en las células (Chikhirzhina et al., 2020).

#### **2.2.4 Relación HMGB1-virus.**

HMGB1 regula la expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, por sus siglas en inglés), receptor del SARS-CoV-1, del SARS-CoV-2, y del coronavirus humano NL63 (Chikhirzhina et al., 2020). También promueve la replicación de virus como el de la hepatitis B (VHB), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el virus de influenza A (donde su asociación con la nucleoproteína viral promueve la actividad de la polimerasa viral), entre otros (Tang et al., 2018).

La proteína VII de AdV es una proteína tardía, pequeña y básica, cuya función principal es formar parte de la nucleocápside viral; sin embargo, está involucrada en el control de la célula huésped, y en la reorganización de la cromatina (Lynch et al., 2021). En experimentos hechos por Avgousti et al., (2016) en los que se analizó el proteoma de la cromatina en presencia y ausencia de la proteína VII, se encontró que cuatro proteínas estaban enriquecidas: SET/TAF-1 (Avgousti et al., 2016; Pied & Wodrich, 2019), HMGB1, HMGB2, y HMGB3, y que la localización de HMGB1 y 2 cambia con la expresión de la proteína VII (Avgousti et al., 2016). HMGB1 se une directamente a la proteína VII (Avgousti et al., 2016; King et al., 2016), cuya localización dentro del núcleo puede ser tanto en la cromatina celular como en los CRs de AdV (Avgousti et al., 2016). La interacción proteína VII-HMGB1 modifica la estructura de la cromatina celular, y retiene a HMGB1 en el núcleo, por lo que también inhibe su papel en la inflamación (Avgousti et al., 2016; King et al., 2016).

En 2021 Lynch et al., publicaron un estudio en el que revelaron que la expresión de la proteína VII de AdV altera el ciclo celular y el crecimiento de las células, ya que en presencia de esta proteína el crecimiento de las células disminuyó un 40%, sin embargo, el crecimiento se recuperó en mutantes no funcionales de las proteínas HMGB1 y SET (o sus homólogos en levaduras). En el mismo estudio determinaron que la proteína VII obstruye la mitosis, lo que permite redirigir los recursos de la célula hacia la replicación viral, y no a la división celular. El mecanismo que propusieron por el cual ocurren estos procesos involucra el secuestro de SET y HMGB1 por la proteína VII que entra en el núcleo en asociación con el genoma viral. Como se describió anteriormente, HMGB1 compite con la histona H1 por el sitio de unión en el DNA, mecanismo que es secuestrado por la proteína VII y permite la expresión de factores involucrados en la progresión del ciclo celular, y a su vez factores que bloquean los puntos de control y permiten la síntesis de moléculas que son secuestradas para el ciclo de replicación viral (Lynch et al., 2021).

Tang et al., (2018) estudiaron el rol de HMGB1 en la infección del HAdV-7 como citocina proinflamatoria. Encontraron que en tiempos tempranos de la infección (hasta las 8 hpi), la localización de HMGB1 fue nuclear en células A549. A partir de las 24 hpi y antes de las 48 hpi detectaron un incremento gradual en la presencia de HMGB1 extracelular, así como un aumento en la expresión de los receptores TLR4, TLR9 y RAGE, y de NF- $\kappa$ B. Interesantemente también aumentaron los niveles de expresión de los mediadores de la inflamación IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6 (Tang et al., 2018).

## **2.3 GLICIRRICINA.**

La glicirricina (GL), también conocida como ácido glicirrónico, es un compuesto triterpenoide (Huan et al., 2021; Wolkerstorfer et al., 2009) que es el principal componente del extracto de la raíz de regaliz (Huan et al., 2021; Mollica et al., 2007; Wolkerstorfer et al., 2009), una hierba usada como planta medicinal en China y otros lugares de Asia. Aunque no se considera tóxica, en cantidades excesivas puede causar efectos secundarios, sobre todo en personas con hipertensión (Huan et al., 2021). Entre los efectos medicinales que tiene están su efecto antiinflamatorio,

antiviral (Huan et al., 2021; Mollica et al., 2007; Wolkerstorfer et al., 2009), antitumoral, antioxidante (Wolkerstorfer et al., 2009).

Los mecanismos por los cuales exhibe actividades antiviral y antiinflamatoria aún no se conocen, sin embargo, se ha encontrado que la GL inhibe varios procesos celulares, entre ellos la SUMOilación, el crecimiento de las células, y la apoptosis (Huan et al., 2021).

Un aspecto interesante de la glicirricina es que es un inhibidor de HMGB1, se une a la proteína en la región central de ambos dominios HMG, donde forma una L, sin disrumpir su estructura secundaria. La región en la que se une es hidrofóbica y ahí establece interacciones de van der Waals. Interesantemente, su sitio de unión se sobrelapa parcialmente con el sitio de unión de HMGB1 al DNA, por lo que se estableció que la GL bloquea la interacción HMGB1-DNA, aun así su efecto nuclear no es tan fuerte como el extracelular al inhibir su función como citocina inflamatoria (Mollica et al., 2007).

Mollica et al., (2007) determinaron que la constante de disociación de la unión entre HMGB1 y GL es del orden de 100  $\mu$ M, mientras que la afinidad de HMGB1 con el DNA desordenado ronda el orden de los 10 nM, y es por esto que su efecto nuclear no es tan marcado (Mollica et al., 2007).

### **2.3.1 Actividad antiviral.**

La GL inhibe la replicación de miembros de la familia *Herpesviridae* (Huan et al., 2021; Wolkerstorfer et al., 2009), que suelen ser muy comunes en la población general, ya que alrededor de 90% de los adultos están infectados con algún tipo de herpes. Por ejemplo, se ha probado su efecto antiviral contra VHS-1, cuya inactivación por GL es irreversible. En 2005 se reportó la actividad antiviral de GL contra KSHV, el mecanismo propuesto involucra el incremento en la expresión de la ciclina viral ORF72 y la baja expresión del antígeno nuclear asociado con latencia (LANA), lo que provoca la muerte selectiva de células infectadas con KSHV. La actividad anti-VEB es dependiente de la dosis, y ocurre en etapas tempranas del ciclo de replicación viral, sin intervenir en la adsorción (Huan et al., 2021). La actividad antiviral de la GL también afecta al virus de Hepatitis C (VHC) (Huan et al., 2021), y al virus de la Hepatitis B (VHB), y en países como Japón las personas

infectadas con estos virus consumen GL como parte de su tratamiento (Mollica et al., 2007). En la infección con VHC se demostró que la inhibición de la fosfolipasa A2 (PLA2G1B) por GL disminuye el número de partículas virales liberadas hasta en un 50%. Con VHB modifica la expresión de antígenos relacionados con HBV en hepatocitos (Huan et al., 2021).

En la infección del virus de la Influenza HMGB1 se une a la nucleoproteína del virus, y esto promueve la actividad de la polimerasa viral, cuando se agrega GL esta asociación se bloquea y se inhibe la replicación viral (Huan et al., 2021); además se encontró que en la infección por influenza, GL puede inducir la producción de interferón (IFN) (Fiore et al., 2008; Wolkerstorfer et al., 2009), e inhibir la producción de CXCL10, IL-6, y del ligando de quimiocina con motivo CC (CCL) 5 cuya síntesis es inducida por la infección del virus de la influenza H5N1 (Huan et al., 2021).

La GL inhibe la replicación de VIH (Fiore et al., 2008; Huan et al., 2021; Wolkerstorfer et al., 2009) dependiendo de la dosis. El mecanismo propuesto involucra la expresión de CCL2 e IL-10, ya que la expresión del correceptor de VIH, el receptor de quimiocinas CC (CCR) 5, es mediada por estas dos proteínas. Además GL promueve la expresión de CCL4 y CCL5, los cuales compiten por el sitio de unión con CCR5 (Huan et al., 2021). GL también mejora la actividad de las células NK (Fiore et al., 2008) y reduce la fluidez de las membranas, que resulta en la reducción de la fusión de la membrana de VIH con la célula huésped (Huan et al., 2021).

GL bloquea la adsorción de distintos coronavirus (Huan et al., 2021; Wolkerstorfer et al., 2009), ya que HMGB1 está implicada en la expresión de ACE2, y también se puede unir directamente a él. Además puede inhibir la proteasa del virus y regular la producción de citocinas proinflamatorias al impedir la liberación de HMGB1 (Huan et al., 2021).

Además de estos virus, también tiene efecto antiviral contra vaccinia, polio tipo 1, alfavirus, flavivirus, y el virus de la estomatitis vesicular (Wolkerstorfer et al., 2009).

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Como se describió en los antecedentes, HMGB1 es una proteína que tiene distintas funciones en la célula y su localización está asociada a cada una de ellas. En el núcleo participa en procesos como la transcripción y replicación, y regula la estructura de la cromatina, mientras que extracelularmente funciona como una señal de alarma que promueve la inflamación. El hecho de que se haya encontrado una relación con la proteína VII de AdV en la que es retenida en el núcleo y que afecta el ciclo celular nos proporciona una nueva visión de la importancia que podría tener esta proteína en el ciclo de replicación del virus, sin embargo los hallazgos de este grupo se han enfocado más en el impacto que tiene HMGB1 y su asociación con la proteína VII en la célula infectada, y no así directamente en el ciclo de replicación del virus. El hecho de que en nuestro grupo se haya encontrado enriquecida en los compartimentos de replicación de adenovirus resulta interesante pues podría estar implicada en algún punto del ciclo de replicación de AdV dadas sus distintas funciones, ya sea participando en la organización de los CRs, en la transcripción de los genes virales, o incluso en la etapa tardía del ciclo de replicación viral siendo partícipe del empaquetamiento del genoma dada su función en la organización de la cromatina y su asociación con la proteína VII. Debido a esto saber si es necesaria en algún punto del ciclo de replicación del virus, o en la formación de los CRs podría darnos información acerca de su función e importancia para la replicación del virus.

### **4. HIPÓTESIS.**

HMGB1 es necesaria para la producción eficiente de progenie viral de adenovirus humano tipo 5.

### **5. OBJETIVOS.**

#### **5.1 OBJETIVO GENERAL.**

Determinar si HMGB1 es necesario para la producción eficiente de progenie viral.

## 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Analizar el efecto de la infección por adenovirus en la localización intracelular de HMGB1.
2. Determinar el efecto de la inhibición de HMGB1 en la localización de DBP en los CRs virales.
3. Determinar el efecto de la inhibición de HMGB1 sobre la producción de progenie viral.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Células y virus

Se utilizó la línea celular HEK 293 (células embrionarias de riñón humano 293) y fibroblastos primarios de prepucio humano (HFF). Fueron cultivadas en monocapa en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino (SB) al 10 % (v/v) o suero fetal bovino (SF) al 10% (v/v), respectivamente; y con los antibióticos, Penicilina-estreptomina, eritromicina y tetraciclina. Y se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de  $CO_2$ .

Las células HEK 293 se utilizaron para la propagación del adenovirus humano tipo 5 (HAdV5-2250), y para su titulación se ocuparon células HFFs.

Las células HFF se utilizaron (sin exceder 13 pases) en los experimentos de inmunofluorescencia que implicaban localización e inhibición de HMGB1. Se infectaron con el HAdV-5 silvestre HAdV5-2250 a una MOI de 30 UFF/célula, con adsorción de 1 h, moviendo cada 15 minutos para asegurar una infección homogénea del cultivo; pasado ese tiempo se retiró el inóculo, se agregó DMEM complementado con 10% (v/v) de SF, penicilina-estreptomina, 2.5 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de eritromicina, fueron mantenidas a 37°C con 5% de  $CO_2$  hasta que se fijaron con formaldehído al 3.7%, se procesaron para inmunofluorescencia, y se analizaron a 4, 16, 24, y 36 horas post-infección (hpi).



## 6.2 Titulación por focos fluorescentes

La titulación de los virus, tanto del stock, como del utilizado para la cuantificación de la progenie viral se hizo con células HFF, las cuales se infectaron con HAdV5-2250 en seis diluciones seriadas cuando alcanzaron el 80% de confluencia. Se procesaron para inmunofluorescencia como se describe adelante y de las muestras obtenidas se tomaron de 6 a 10 fotos de campos distintos, se contaron las células infectadas y las no infectadas y el título se obtuvo utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Título en } \frac{UFF}{mL} = \frac{(\text{Número de células infectadas}) \times (\text{Dilución}^{-1})}{\text{Volumen inicial de lisado}}$$

## 6.3 Anticuerpos

Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-DBP B6-8 hecho en ratón como anticuerpo primario, y el anticuerpo monoclonal de conejo recombinante anti-HMGB1 (SA39-03 de Invitrogen). Los anticuerpos secundarios fueron anti-ratón acoplado a Alexa fluor 488, anti conejo acoplado a Alexa fluor 488, y anti-ratón acoplado a Alexa fluor 568 (Invitrogen).

## 6.4 Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en placas de 12 o 24 pozos sobre cubreobjetos estériles, se infectaron con HAd5-2250 cuando alcanzaron 80% de confluencia. Se quitó el medio de cultivo de las células, y se lavaron con PBS dos veces, posteriormente se fijaron con formaldehído al 3.7% por 20 minutos a temperatura ambiente (TA), pasado ese tiempo se quitó el formaldehído y se lavaron tres veces con PBS frío en agitación. Después se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% durante 5 minutos a TA, luego se hicieron tres lavados con PBS frío en agitación, seguido de la incubación toda la noche con el o los anticuerpos primarios a 4°C. Al día siguiente se quitó el inóculo y se lavaron tres veces con PBS frío en agitación, y se incubaron 2 h a TA en agitación con el o los anticuerpos secundarios mientras se protegían de la luz, posteriormente se lavaron tres veces con PBS frío en agitación, y se incubaron por 5 minutos con DAPI, después se lavaron tres veces con PBS frío en

agitación. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con 2  $\mu$ l de glicerol al 10%, y se sellaron con barniz transparente. Posteriormente se analizaron en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc.) con un objetivo de 63X con aceite de inmersión en los experimentos de localización de HMGB1; y con el objetivo de 20X para la titulación de los virus, y las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 6.5 Glicirricina

En los experimentos en los que se inhibió HMGB1 se utilizó glicirricina, (SIGMA, 50531, como sal de amonio de ácido glicirrizico de la raíz de glycyrrhiza). Mollica et al., (2007) determinaron la constante de disociación de HMGB1 con la glicirricina, por lo tanto, basándonos en ella se decidió utilizar a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  a partir de un stock de 0.01 M, el cual fue agregado al medio de cultivo. Para los experimentos de localización de HMGB1 se agregó el tratamiento en las células correspondientes 2 h antes del inicio del ciclo de infección del virus, y se dejó todo el tiempo hasta que fueron fijadas para la inmunofluorescencia, como se muestra en el diagrama de la Figura 7.



**Figura 7.** Diagrama de la metodología usada para los experimentos de localización de HMGB1 en los que se inhibió con glicirricina. Se muestra una línea del tiempo representando el ciclo de replicación del virus con las horas post-infección a las que se hicieron los tratamientos, las líneas que salen desde -2 indican el tiempo en del tratamiento con glicirricina, y los tiempos post-infección indican a qué hora fueron fijadas las células.

Para los experimentos de producción de progenie viral la glicirricina se ocupó a la misma concentración, pero se agregó en distintos tiempos post-infección (Figura 8) a lo largo del ciclo de replicación del virus y hasta que las células fueron cosechadas a 36 hpi.



**Figura 8.** Diagrama de la metodología usada para los experimentos de producción de progenie viral en tratamiento con glicirricina. Se muestra una línea del tiempo representando el ciclo de replicación del virus con las horas post-infección a las que se hicieron los tratamientos, las líneas junto a los números indican el tiempo en del tratamiento con glicirricina, y los tiempos post-infección indican a qué hora fueron cosechadas las células.

## 6.6 Análisis de imágenes

Todas las imágenes fueron analizadas utilizando el software IMAGEJ/FIJI.

Las imágenes obtenidas para la titulación del virus stock se contaron manualmente ajustando el brillo y contraste de la misma manera para todas las fotos de un mismo canal: azul para DNA y verde para DBP, esto con el fin de tener una mejor visualización.

Las imágenes correspondientes a la titulación por focos fluorescentes de la progenie viral fueron convertidas a imágenes en 8 bits a las que se les sustrajo el ruido de fondo de acuerdo con el promedio de fluorescencia de las imágenes en zonas en las que no había células, y a partir de las cuales se creó una máscara binaria tomando como base la imagen del DNA y posteriormente se contabilizó la intensidad de fluorescencia en el canal verde que correspondía a la proteína DBP, y se hizo una estimación en la que los valores arriba de 2.5 se tomaron como positivos para la fluorescencia de la proteína DBP.

A las imágenes para determinar la localización de HMGB1 se les ajustó el brillo y contraste para quitar el mayor ruido de fondo y mejorar las imágenes, y posteriormente fueron analizadas manualmente en los tres canales: rojo para DBP,

verde para HMGB1 y azul para DNA. Se contó el número de células y la localización de las proteínas para categorizarlas en distintas poblaciones.

## **6.7 Análisis por coeficiente de correlación de Pearson**

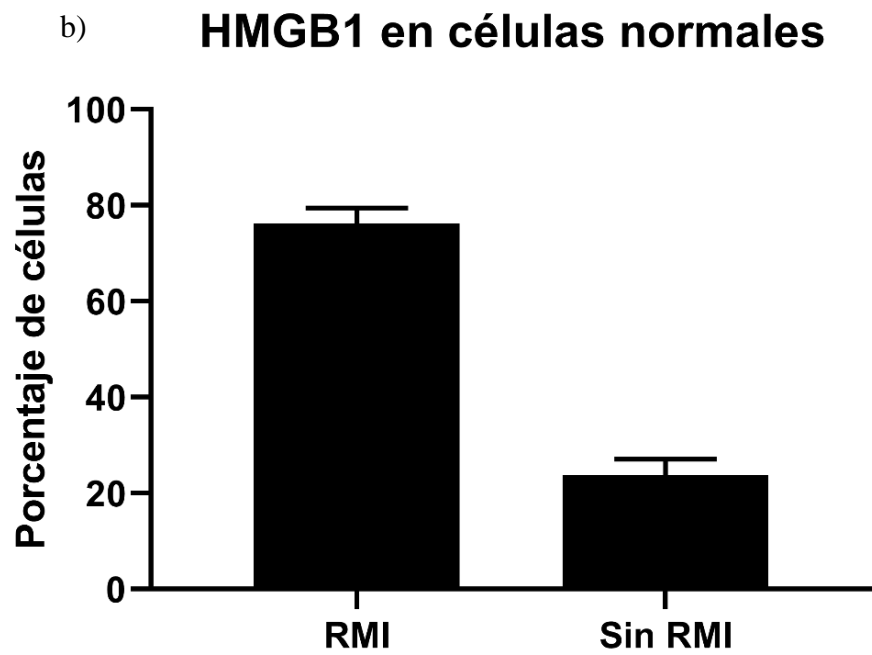
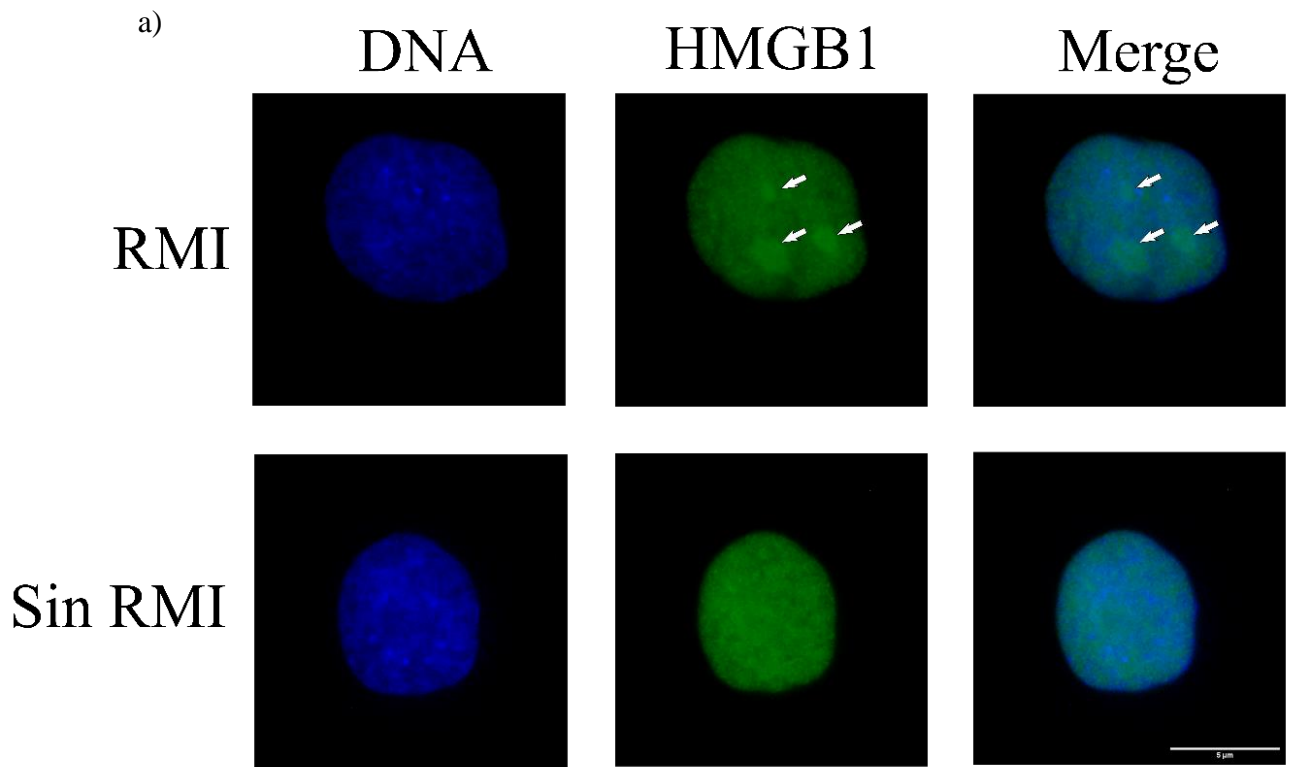
Las imágenes en las que se determinó la localización de HMGB1 fueron convertidas a imágenes en 8 bits a las que se les sustrajo el ruido de fondo como se describió antes, y posteriormente fueron analizadas en el software IMAGEJ/FIJI usando el plugin JACoP, para realizar un análisis de correlación de Pearson ( $r$ ), mediante el cual se puede estimar la colocalización de acuerdo con la intensidad de señal de dos imágenes, siendo que cuando  $r=1$  existe una correlación positiva o hay colocalización, cuando  $r=0$  no existe correlación, y cuando  $r=-1$  la correlación es negativa, lo que quiere decir que las señales de ambos fluoróforos se repelen (Bolte & Cordelières, 2006).

## **7. RESULTADOS.**

### **7.1 HMGB1 se localiza en dos distribuciones distintas en la célula.**

Con el fin de determinar la localización intracelular de HMGB1, realizamos dos experimentos independientes en los que las células HFF fueron procesadas para microscopía de inmunofluorescencia, como se describió en la metodología. Se tomaron fotos de distintos campos de las células y se contaron manualmente para determinar la localización de HMGB1, usando un anticuerpo contra la proteína y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Se usó DAPI para visualizar el DNA.

Los resultados mostraron que HMGB1 se localiza en una distribución en la que se pueden observar regiones de mayor intensidad de fluorescencia (que decidimos llamar Regiones de Mayor Intensidad o RMI) sobre la distribución punteada que abarca todo el núcleo. Y también, en una distribución con apariencia de puntos distribuidos por todo el núcleo con algunas regiones con mayor densidad de puntos (que denominamos sin RMI), como se muestra en el panel a) de la Figura 9.



**Figura 9.** Localización normal de HMGB1 en células HFF. a) microscopía de inmunofluorescencia de células HFF representativas de las distintas distribuciones de HMGB1 en una célula normal. Las flechas señalan las RMIs. b) Gráfica de la cuantificación de las poblaciones de células con cada una de las distribuciones en las que se localiza HMGB1.

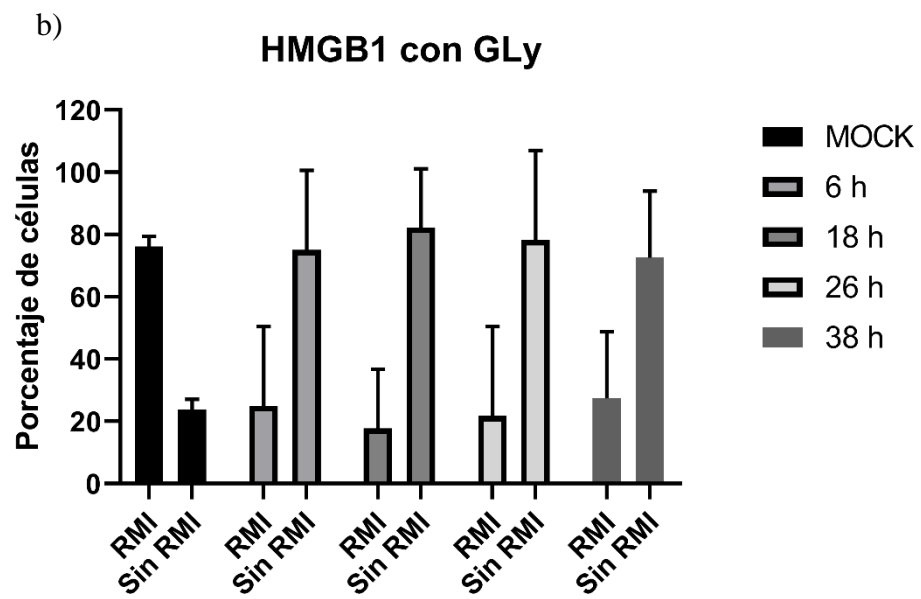
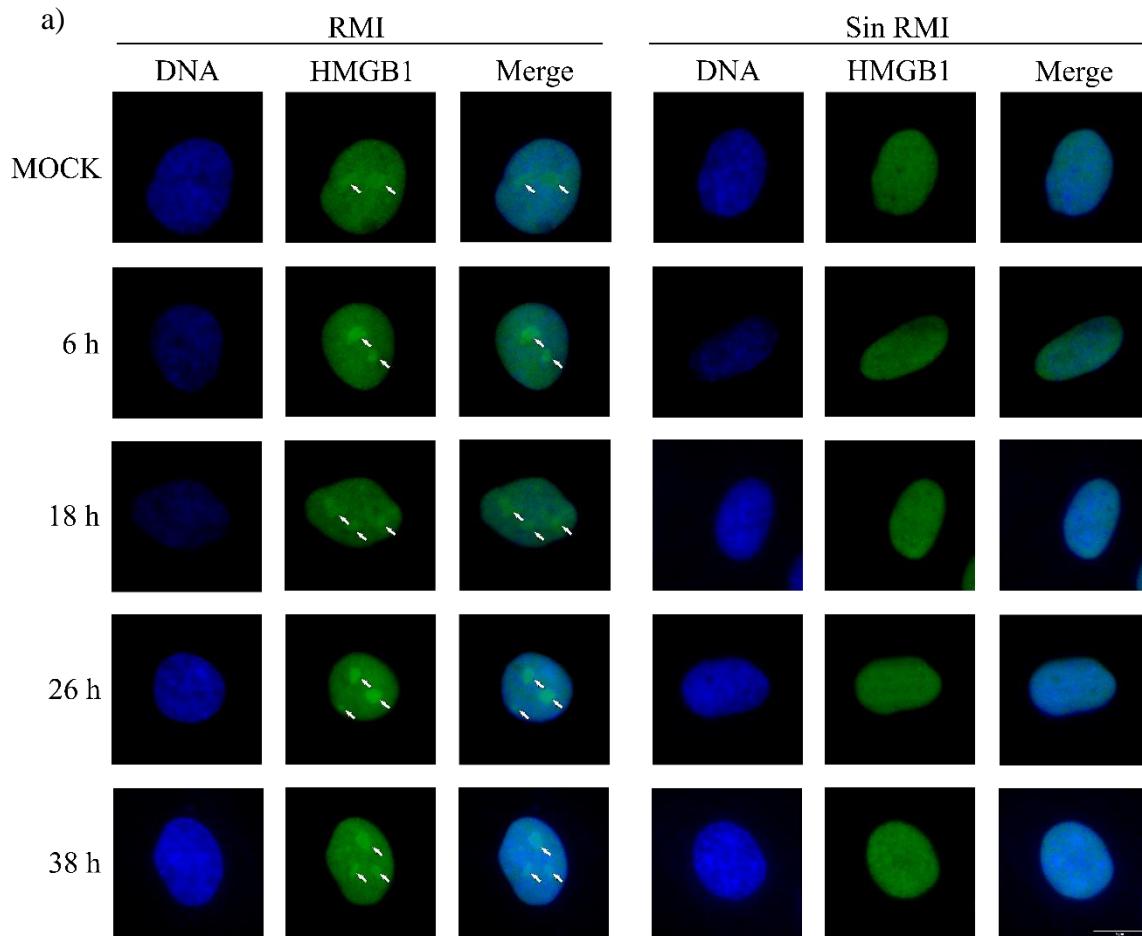
La cuantificación de las células mostró que el 76.2% de las células se encontraban en una distribución que contiene RMI, mientras que en el 23.8% no se observaron RMIs (Figura 9, panel b)).

## **7.2 La glicirricina disminuye el porcentaje de células en las que HMGB1 se localiza en RMI.**

Con el fin de determinar el efecto que tiene el tratamiento de glicirricina en la localización intracelular de HMGB1, realizamos dos experimentos independientes en los que se cultivaron células HFF que se trataron con glicirricina durante 6, 18, 26, y 38 h. Y después se procesaron para inmunofluorescencia, como se describe en metodología.

Los resultados arrojaron que HMGB1 se localiza tanto en RMI como en una distribución punteada por todo el núcleo de las células (sin RMI) (Figura 10, a)), tal como se observó en las células no tratadas.

Posteriormente se cuantificaron las poblaciones de células con cada tipo de distribución, y se encontró que en las células que fueron sometidas al tratamiento la proporción de células con RMI disminuyó considerablemente, independientemente del tiempo de duración del tratamiento. A las 6 h en presencia de glicirricina el 24.9% de las células tenían RMI, a las 18 h 17.8%, a las 26 h 21.8%, y a las 38 h 27.4%, lo que representa una disminución de alrededor de un 53% de células con RMI en comparación con las células no tratadas (Figura 10, b)).



**Figura 10.** Distribución de HMGB1 en células tratadas con glicirricina a diferentes tiempos. a) microscopía de inmunofluorescencia mostrando las distribuciones de HMGB1 en RMI y punteada a las 6, 18, 26, y 38 h de tratamiento con glicirricina. Las flechas blancas indican las RMIs. b) cuantificación de las poblaciones de células con cada una de las localizaciones de HMGB1 en los distintos tiempos de tratamiento con glicirricina.

Estos datos revelan que la glicirricina indujo un cambio en la distribución intracelular de HMGB1 siendo que se encontraron más células con distribución punteada que carece de RMI, que en las que sí hay RMI, y se invirtieron los valores de estas poblaciones.

### **7.3 La infección de HAdV5 relocaliza a HMGB1.**

Para determinar el efecto de la infección de HAdV5 en la localización intracelular de HMGB1, se hicieron dos experimentos independientes procesando células infectadas con HAdV5 para microscopía de inmunofluorescencia, donde se evaluaron 4, 16, 24 y 36 hpi. Además de DAPI y el anticuerpo contra HMGB1, en estos experimentos se incluyó un anticuerpo que reconoce a la proteína viral DBP la cual funciona como un marcador de los HAdVCR; posteriormente las distintas poblaciones se cuantificaron manualmente.

En células HFF infectadas con el virus HAdV5, se observó que la distribución de HMGB1, punteada (sin RMI) y en RMI, se mantiene en las células infectadas. Además, HMGB1 se observó en regiones de mayor intensidad, más numerosas, con una apariencia distinta a las RMI y en cambio, más parecida a los compartimentos de replicación de HAdV; y al comparar los canales correspondientes a HMGB1 (Alexa 488-verde) y DBP (Alexa 568-rojo) se observó que su localización coincide en estos sitios (Figura 11, a)). Interesantemente, el tipo de distribución de HMGB1 que coincidió con los CR solo se presentó en los tiempos postinfección 16, 24, y 36 hpi, los cuales corresponden a los tiempos en los que los CR pueden visualizarse con la proteína viral DBP (a las 4 hpi la proteína DBP todavía no se asocia a los sitios en los que se localiza el genoma viral en el núcleo). Cabe mencionar que en las micrografías correspondientes al canal de DBP, se ajustó el brillo y contraste de las células con el fin de tener una figura en donde se



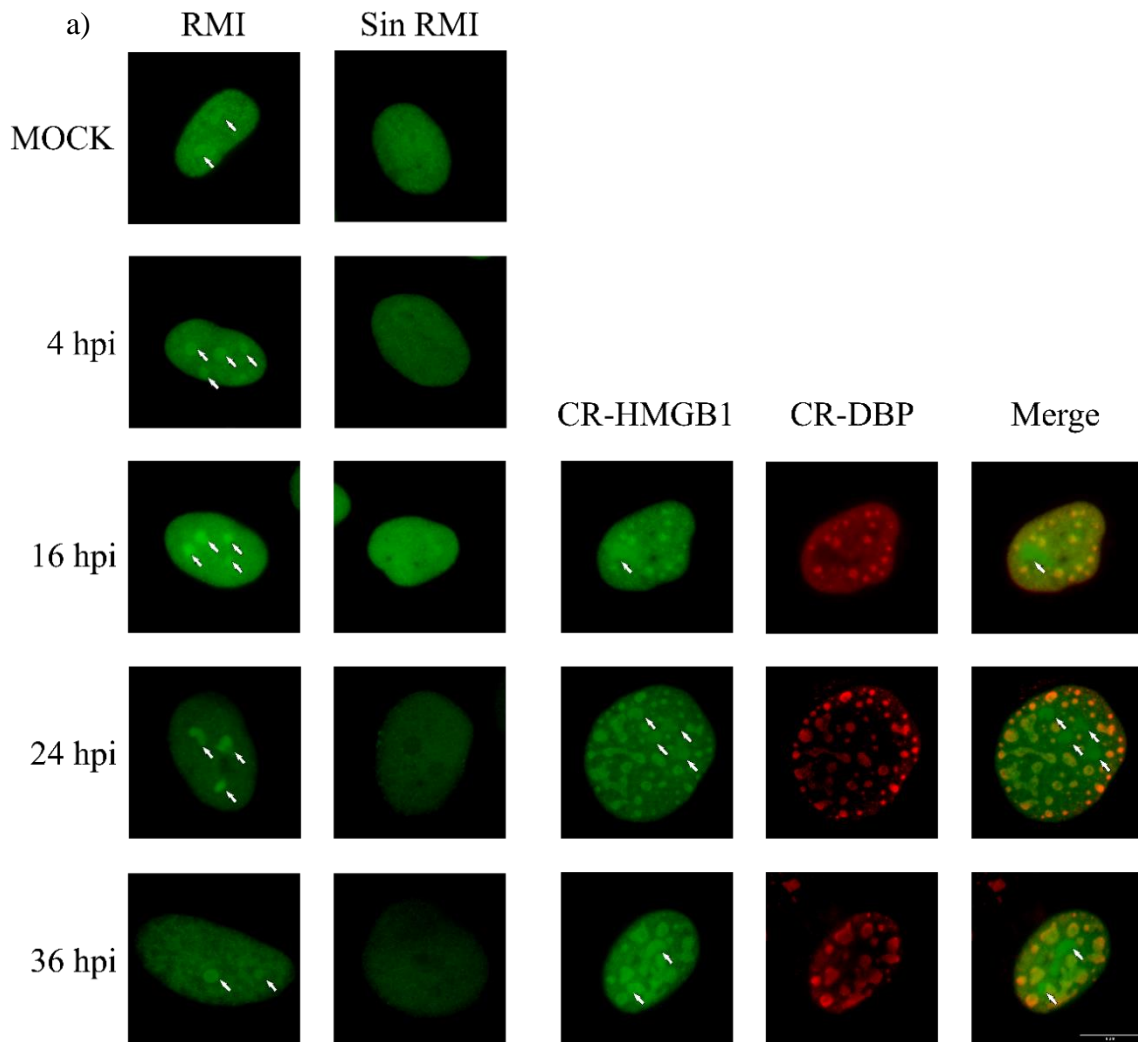
puedan ver claramente los CR. Las mismas micrografías se muestran sin modificaciones, con los mismos parámetros de captura y procesamiento, en la Figura A1 en los anexos.

Se cuantificaron las células de cada distribución (Figura 11, panel b)), donde las imágenes de las células contadas fueron procesadas en las mismas condiciones de brillo y contraste para todas las imágenes del mismo canal. Los resultados mostraron que la infección de HAdV5 tiene un efecto casi idéntico al de la glicirricina a las 4 hpi, pues los valores de las poblaciones, con y sin RMI, se invirtieron en comparación con las células mock, siendo más grande la población de células en donde HMGB1 no se observó en RMI a este tiempo postinfección.

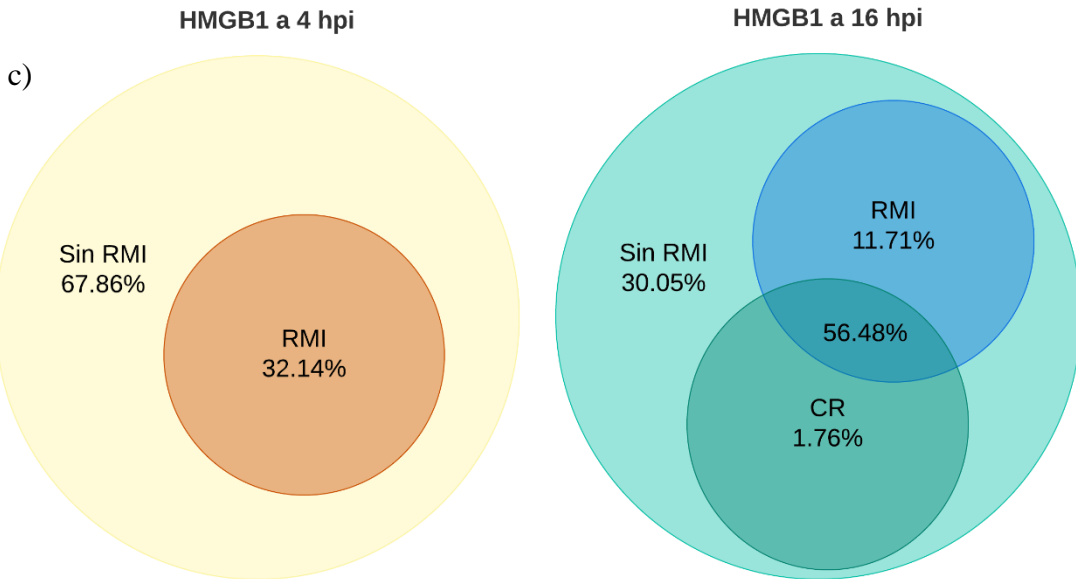
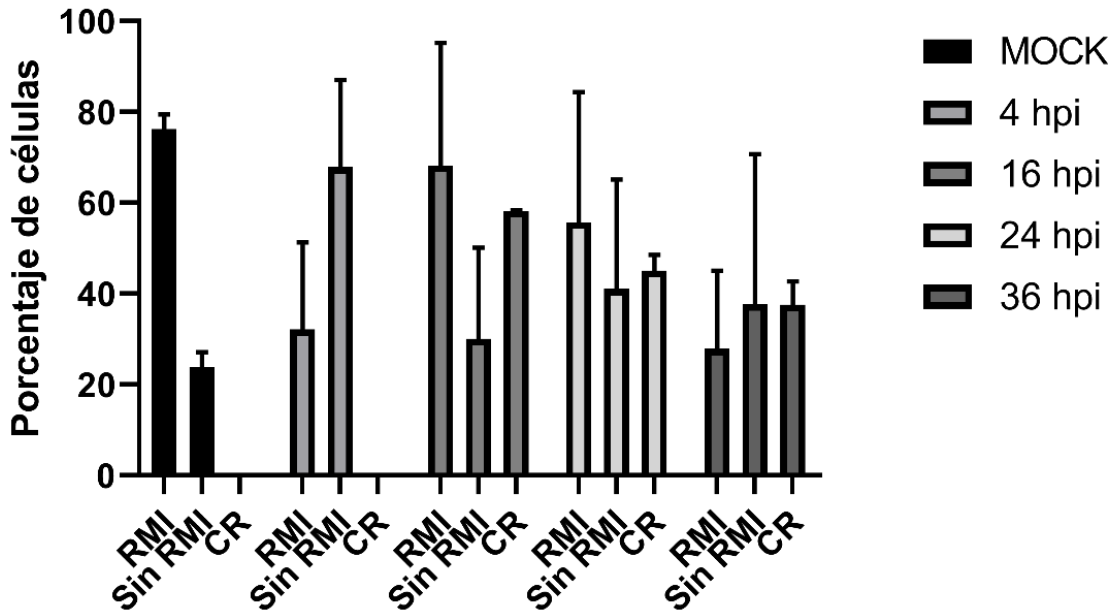
En los tiempos posteriores a 4 hpi (16, 24 y 36 hpi) la población de células sin RMI fue menor. Mientras que la población de células en las que HMGB1 se observó con una distribución que coincidió con los CR fue mayor. Para las 36 hpi, un tiempo postinfección que corresponde a una etapa tardía en la que los CR tienen una morfología más compleja, las poblaciones sin RMI y con HMGB1 en CR presentaron un porcentaje de células similar, mientras que la población con RMI fue la más baja. Cabe destacar que una proporción de células presentó la distribución de HMGB1 tanto en RMI como en CR. Los porcentajes de las poblaciones de células con las diferentes distribuciones se muestran en los diagramas de venn en el panel c) de la Figura 11.

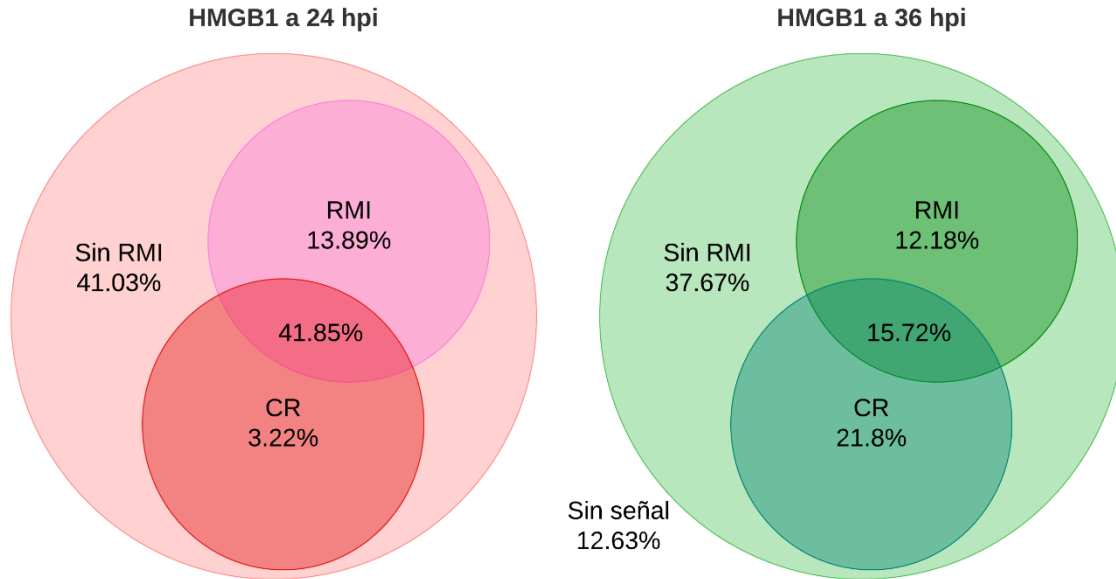
Se sabe que la proteína DBP tiene una distribución intracelular dinámica que cambia a lo largo del ciclo de replicación viral. En etapas tempranas de la infección la DBP se localiza en pequeños puntos distribuidos por todo el núcleo; más tarde, estos puntos aumentan de tamaño y se reorganizan en estructuras con apariencia de anillos que eventualmente coalescen, formando estructuras morfológicamente complejas que ocupan grandes regiones del núcleo. La distribución de DBP en puntos y anillos corresponde a los tiempos postinfección en los que se expresan los genes virales y se replica el genoma viral, mientras que el tiempo postinfección cuando éstas coalescen corresponde al ensamblaje y producción de progenie viral. Adicionalmente, DBP puede mostrar una distribución intracelular difusa, pero se

desconoce si en estas células puede haber replicación productiva del virus. Por lo anterior se analizó la distribución de HMGB1 en las células en las que DBP se encuentra en CR (Figura 11, d)). Los resultados mostraron que en todas las células infectadas en las que DBP está en CR, HMGB1 y DBP coinciden.

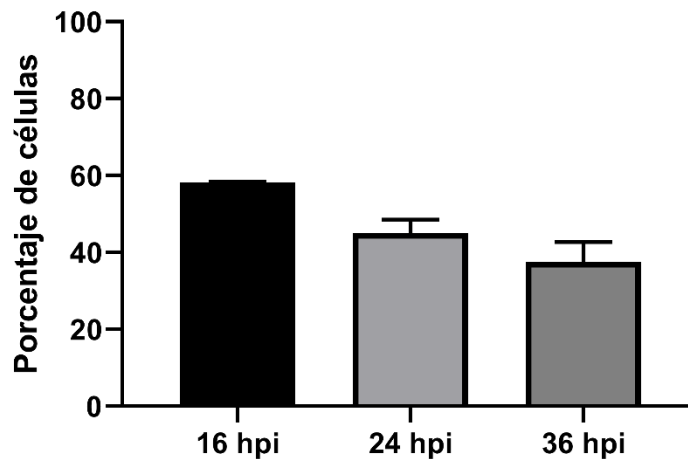


b) **HMGB1 en infección con HAdV5**





d) **Células infectadas que tienen CR**



**Figura 11.** Localización de HMGB1 en células infectadas con HAdV5. a) microscopía de inmunofluorescencia de células HFF infectadas con HAdV5 a diferentes tiempos post infección. Se muestran las distribuciones de HMGB1 como RMI, punteada por todo el núcleo sin RMI, y en CR a partir de las 16 hpi. El brillo y contraste de DBP se modificó independientemente para cada célula con el fin de tener una figura más clara. Las flechas blancas señalan las RMIs. b) cuantificación de las poblaciones de células con RMI, con HMGB1 punteada sin RMI o en CR. c) diagramas de venn representando las poblaciones de células con cada una de las tres distribuciones de HMGB1 a 4, 16, 24, y 36 hpi. d) cuantificación de las células infectadas en las que DBP se observó en CR.

Los resultados indican que la infección con HAdV5 induce la redistribución de HMGB1 de RMI a células donde no se observan RMI en tiempos tempranos de la infección. Sin embargo, en tiempos correspondientes a la transición de la fase temprana a la fase tardía, y a lo largo de la fase tardía del ciclo de replicación del virus, la infección redistribuye a HMGB1 para volver a formar RMIs y CR.

## **7.4 La glicirricina afecta la formación de CR.**

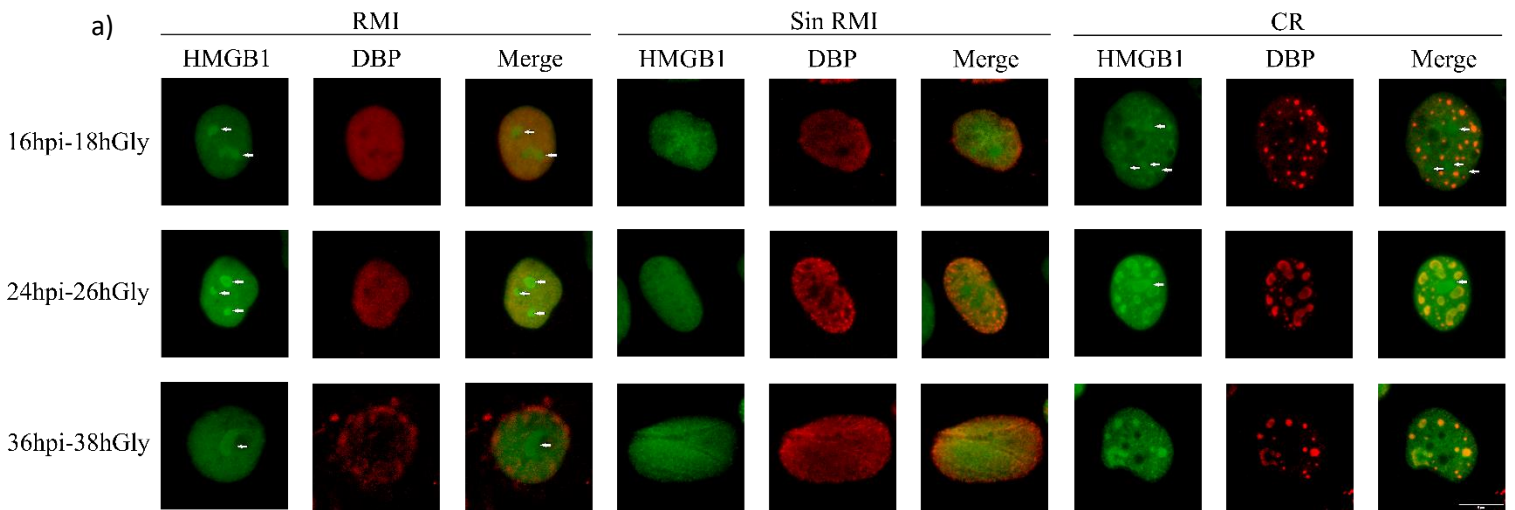
Con el fin de determinar el efecto de la glicirricina en la localización intracelular de HMGB1 en el contexto de la infección con HAdV5, se hicieron dos experimentos independientes en los que se trataron con glicirricina células infectadas con HAdV5 desde 2 h antes del inicio de la infección, y se analizaron a 4, 16, 24 y 36 hpi por medio de microscopía de inmunofluorescencia.

Acorde con lo encontrado en las células HFFs infectadas con HAdV5, la distribución de HMGB1 en una célula infectada y tratada con glicirricina se observó en RMI, punteada por todo el núcleo sin RMI, y en CR, esta última presentándose solamente en los tiempos posteriores a la transición de la fase temprana a la fase tardía del ciclo de replicación del virus (Figura 12, a)). La cuantificación de las poblaciones se muestra en la Figura 12, b).

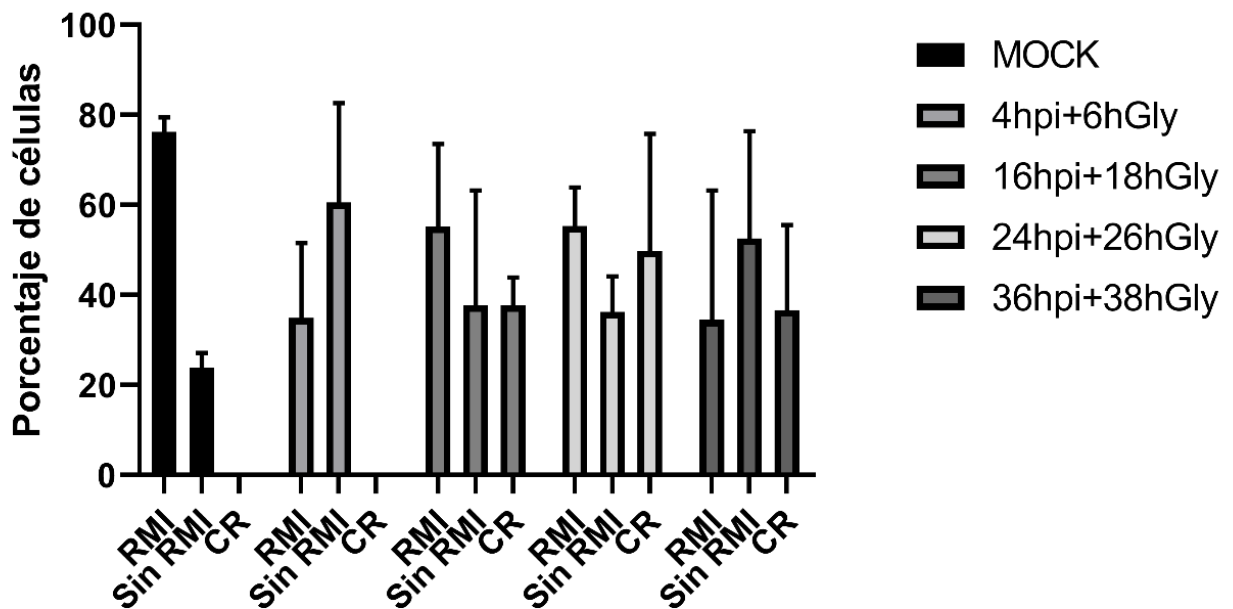
Al comparar cada una de las distribuciones de HMGB1 en las células infectadas con las células que fueron infectadas y tratadas con glicirricina por medio del cociente de sus valores (Figura 12, c)) se observó que, si bien la mayoría de los cambios que existen en cada una de las condiciones son pequeños, las diferencias más grandes se observaron en las células en las que HMGB1 formaba CR a las 16 hpi, pues aumentaron un 54%. Mientras que las células en donde HMGB1 no formaba RMIs disminuyeron un 20% y 36%, a 16 y 36 hpi, respectivamente.

Es interesante que como se observó en las células que solo fueron infectadas o que solo fueron tratadas con glicirricina, en las células en las que ambas condiciones estuvieron presentes, HMGB1 se redistribuyó de RMI a células en donde no se formaban las RMI a las 4 hpi, pero en tiempos posteriores la población de células con RMIs volvió a aumentar, indicando que si bien la entrada del virus al núcleo

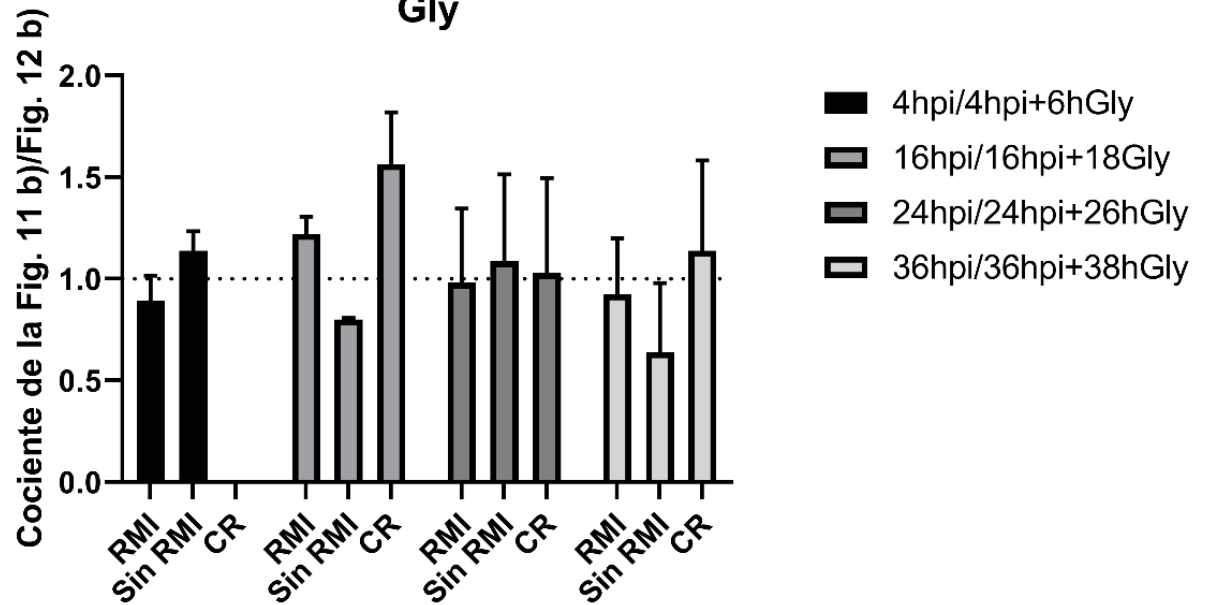
redistribuye las RMI, la expresión de los genes virales y los tiempos posteriores a la transición a la fase tardía, parecen redistribuir nuevamente a HMGB1 de vuelta a las RMI además de a CR, aún en presencia de glicirricina.



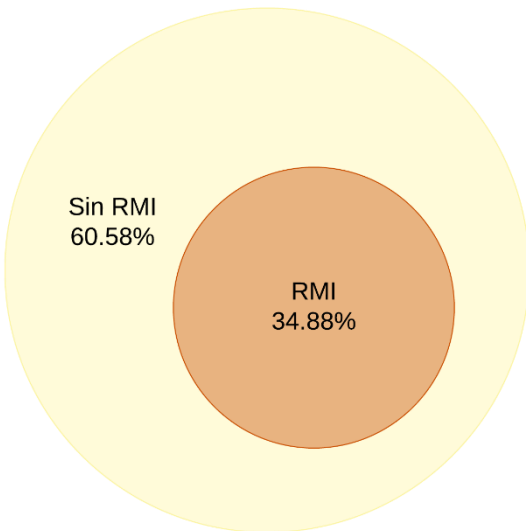
b) **HMGB1 en infección con HAdV5 + Gly**



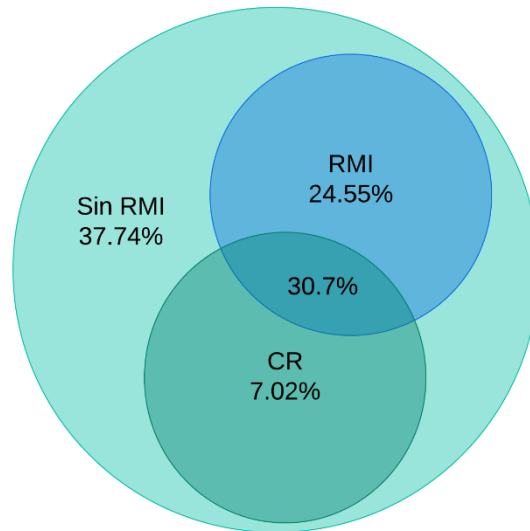
c) **HMGB1 en infección con HAdV5 / HMGB1 en infección con HAdV5 + Gly**



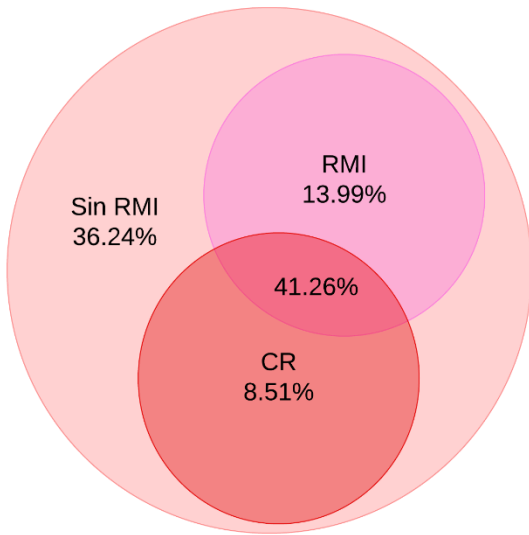
d) **HMGB1 a 4 hpi + 6 h Gly**



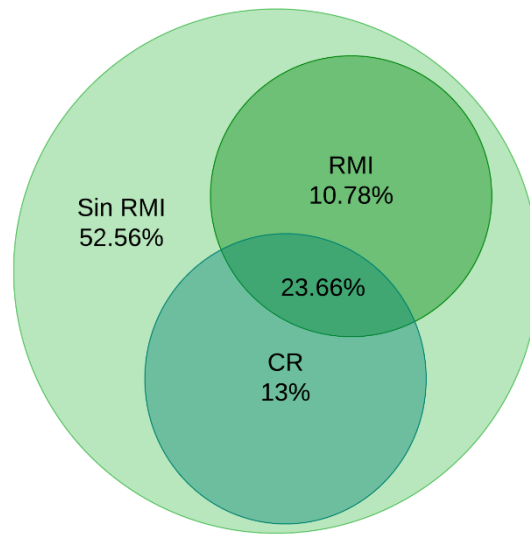
**HMGB1 a 16 hpi + 18 h Gly**



HMGB1 a 24 hpi + 26 h Gly

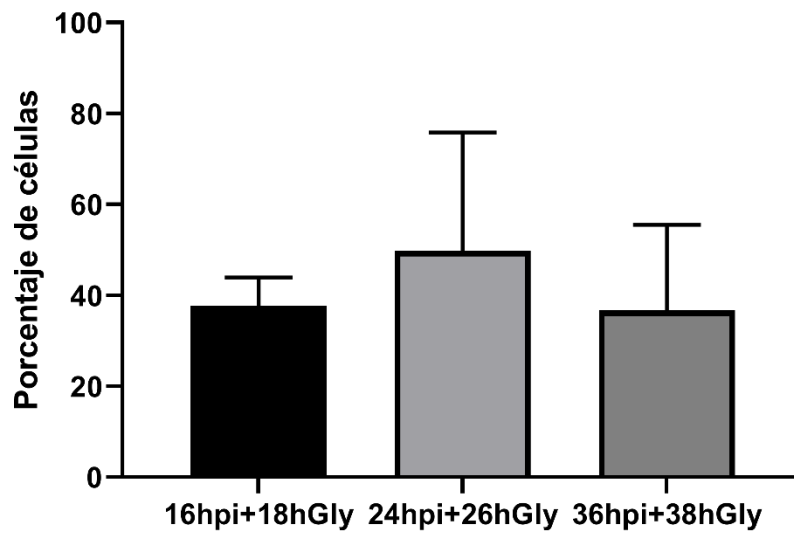


HMGB1 a 36 hpi + 38 h Gly

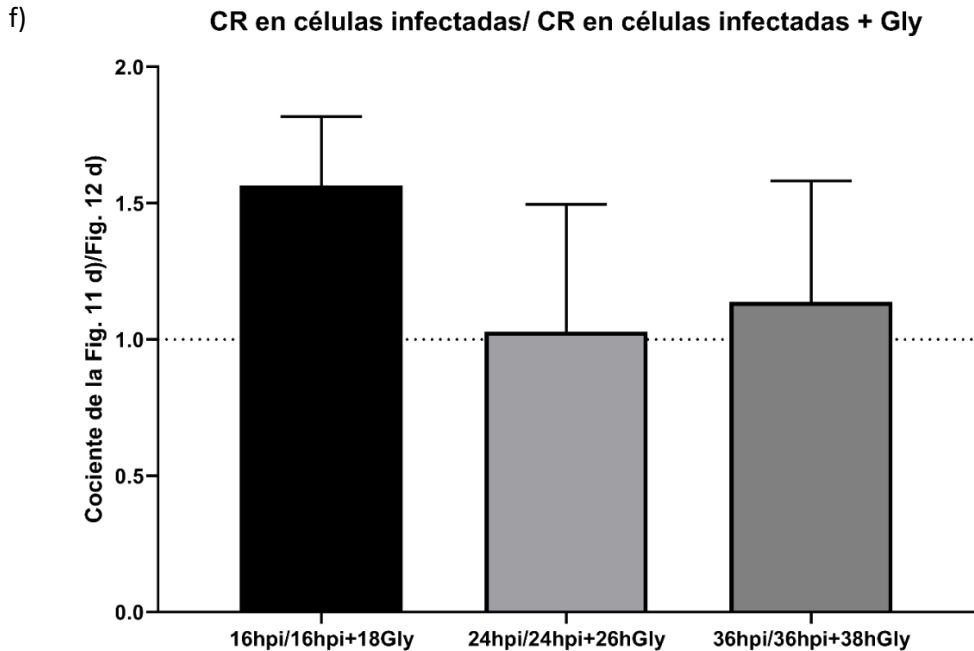


### Células infectadas en tratamiento con Gly que tienen CR

e)







**Figura 12.** Distribución de HMGB1 en células infectadas con HAdV5 y tratadas con glicirricina a diferentes tiempos post infección. a) microscopía de inmunofluorescencia de células HFF infectadas con HAdV5 en tratamiento con glicirricina, se muestra HMGB1 y DBP (La figura sin modificación de brillo y contraste en DBP se puede ver en la Figura A2 en el anexo). b) cuantificación de las células con distintas distribuciones de HMGB1. c) comparación de las distribuciones de HMGB1 en células infectadas vs células infectadas y tratadas con glicirricina. d) diagramas de venn representando las distintas poblaciones de células con HMGB1 con RMI, sin RMI y en CR. e) cuantificación de células en las que DBP forma CR. f) comparación de las células en las que se formaron CR en células infectadas vs células infectadas y tratadas con glicirricina.

Como se puede ver en los diagramas de venn del panel d) de la Figura 12, en las células infectadas y tratadas con glicirricina también se observó una población de células en la que HMGB1 se localizó tanto en RMI, como en CR en tiempos correspondientes a la fase tardía del ciclo de infección.

Al analizar la coincidencia entre las distribuciones de HMGB1 y DBP (Figura 12, e)), pudimos observar que en las células en las que DBP formaba CR, HMGB1 y DBP coincidían en su localización aún en el tratamiento con glicirricina. Mientras que cuando comparamos las células en las que DBP forma CR con y sin tratamiento con

glicirricina (Figura 12, f)) observamos que la glicirricina disminuyó considerablemente las células con distribución de DBP en CR a las 16 hpi (56%), aumentó ligeramente a las 24 hpi, y disminuyó ligeramente a las 36 hpi.

Estos datos sugieren que, aunque los tipos de distribución que muestra HMGB1 en una célula infectada se mantienen con el tratamiento de glicirricina, la población de células en las que DBP forma CR, y en las cuales la localización de HMGB1 y DBP coinciden, es alterado por glicirricina, teniendo el efecto más marcado en la disminución que se observó a 16 hpi. Por lo tanto, concluimos que el efecto de la infección en la localización de HMGB1 ya sea con o sin Gly, es la relocalización de la HMGB1 a RMI y a CR.

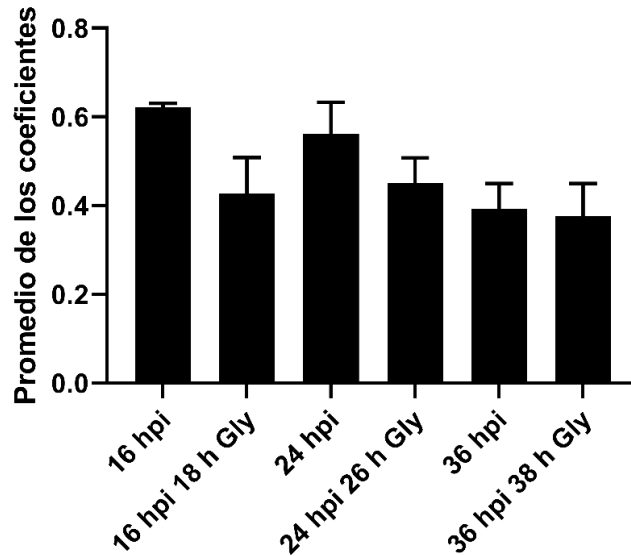
## **7.5 Análisis por coeficiente de correlación de Pearson**

Decidimos hacer un análisis del coeficiente de correlación de Pearson como una forma de determinar si la distribución de las señales de fluorescencia de HMGB1 y DBP muestran colocalización.

El coeficiente de correlación de Pearson relaciona la intensidad de fluorescencia de dos imágenes y proporciona una estimación de la colocalización entre ellas, siendo que cuando el coeficiente de correlación de Pearson es 1 la correlación es positiva, cuando es 0 no existe correlación, y cuando es -1 es una correlación negativa (Bolte & Cordelières, 2006). Los datos se muestran en la Figura 13 en donde se puede ver que existen valores positivos, pero solo a 16 y 24 hpi son mayores a 0.5, mientras que los demás valores están por debajo de 0.5, lo que indica una estimación relativamente pobre sobre la colocalización entre HMGB1 y DBP, ya que un coeficiente entre 0.5 y -0.5 no permite hacer una predicción confiable.

Sin embargo, es claro que la coincidencia en la distribución de HMGB1 y DBP en las células infectadas observada por microscopía de epifluorescencia sugiere que éstas podrían colocalizar y que HMGB1 es relocalizado a los CR. Para confirmarlo será interesante analizar la distribución de las proteínas por microscopía confocal y de mayor resolución.

### Colocalización por coeficiente de Pearson



**Figura 13.** Análisis de la colocalización de HMGB1 y DBP por coeficiente de correlación de Pearson. Resultados a partir de dos experimentos independientes.

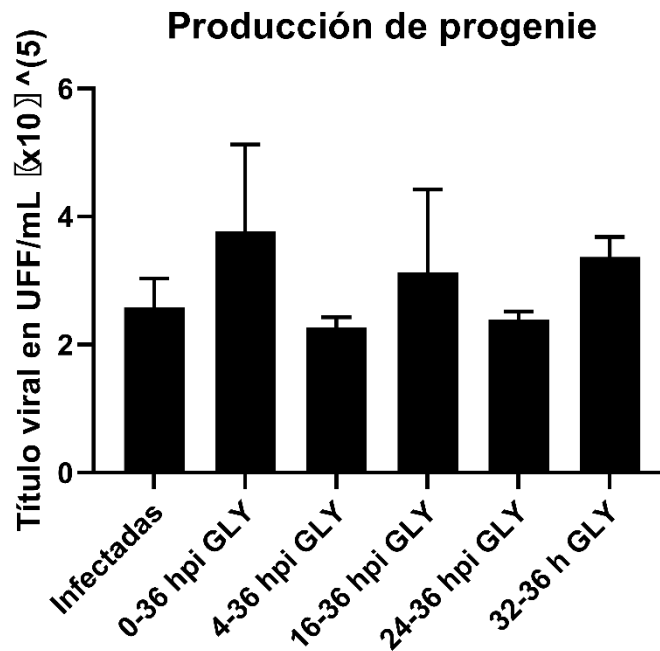
## 7.6 Producción de progenie viral

Para determinar el efecto de la inhibición de HMGB1 por glicirricina en la producción de progenie viral, se hizo un experimento en el que se infectaron células HFFs con HAdV5 y se trataron con glicirricina a diferentes tiempos postinfección, como se muestra en la Figura 8 en el apartado de metodología. Por limitaciones de tiempo, estos resultados corresponden a un solo experimento, por lo que se tendrá que repetir para confirmar si los datos son reproducibles; por lo tanto, estos datos se muestran como resultados preliminares.

La mayor producción de progenie viral respecto a las células que solo fueron infectadas, se obtuvo con el tratamiento de glicirricina desde el tiempo 0 hasta las 36 hpi con un aumento de 46%; y la menor producción fue en el tratamiento de 4 a 36 hpi con una disminución de 12% comparándolas con las células que solo fueron infectadas.

Dado que los tiempos en los que se inhibió HMGB1 corresponden a distintos momentos del ciclo de replicación del virus, esperábamos poder determinar si la

glicirricina tenía un efecto en alguno de los pasos del ciclo de replicación viral. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten llegar a alguna conclusión puesto que en algunos tiempos el tratamiento tuvo un efecto positivo y en otros negativo sobre la producción de progenie, por lo tanto además de la repetición del experimento deberán de evaluarse otros procesos como la cuantificación de la expresión de genes virales, la eficiencia de la síntesis del DNA viral, o el análisis de la composición de los CR con y sin tratamiento de glicirricina, para determinar si la inhibición de HMGB1 con glicirricina afecta alguna de las funciones conocidas de la proteína que pudieran estar implicadas en su asociación con los CR.



**Figura 14.** Cuantificación de la producción de progenie viral a partir de la titulación por focos fluorescentes de los virus producidos en cada una de las condiciones indicadas.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

HMGB1 es una proteína celular con múltiples funciones, que interacciona directamente con la proteína VII de HAdV, y que fue encontrada como la proteína celular que se encuentra más enriquecida en los CR, por lo que se eligió como un buen candidato para estudiar su función en el ciclo de replicación de HAdV5. Los

experimentos realizados en esta tesis son un primer acercamiento para conocer su localización intracelular, si ésta cambia en la infección con HAdV, y si su inhibición afecta la producción de progenie viral. Para ello se planeó analizar su localización con microscopía de inmunofluorescencia, y determinar el efecto que tendría su inhibición tanto en su localización como en la producción de progenie viral.

Los resultados de los experimentos nos han permitido concluir que la localización de HMGB1 en células normales, se observa en una distribución punteada por todo el núcleo y en RMI sobre una distribución punteada, donde la población con RMI es mayor a la que no las tiene. Además, se encontró que el tratamiento con glicirricina a 100  $\mu$ M invirtió las poblaciones de células con cada una de las dos distribuciones, sin importar el tiempo de duración del tratamiento. La concentración de glicirricina se eligió tomando en cuenta la constante de disociación de HMGB1 con glicirricina y con el DNA (Mollica et al., 2007), y las concentraciones probadas en otros virus, donde por ejemplo, en ensayos hechos con SARS-CoV-2 utilizaron un rango de concentraciones en las cuales se encuentra la que utilizamos, y ese rango mostró que SARS-CoV-2 es inhibido por glicirricina (van de Sand et al., 2021).

Aunque HMGB1 es una proteína muy estudiada, se conoce poco de su localización intranuclear más allá de que se encuentra en el núcleo asociada a los nucleosomas, por lo tanto, no sabemos a qué corresponden las RMI encontradas en estos experimentos. Sin embargo, se sabe que otras proteínas celulares con múltiples funciones implicadas en, por ejemplo, la regulación de la cromatina o la regulación de la transcripción, se localizan en sitios intranucleares definidos llamados dominios nucleares. Ya que HMGB1 también es una proteína multifuncional implicada en algunos de los procesos que tienen lugar en estos dominios nucleares, pensamos que las RMI podrían corresponder a alguno de ellos, ya sea el nucleolo, los cuerpos de Cajal, los cuerpos de PML, los gránulos de intercromatina, entre otros. Dado que la infección por HAdV induce la reorganización de estos dominios nucleares, e induce la redistribución de sus componentes cooptando algunos a los CR (Hidalgo et al., 2016), y que en los experimentos de esta tesis pudimos observar que, en la etapa temprana de la infección las RMI se redistribuyen y su población disminuye,

mientras que en tiempos posteriores de la infección (a partir de la transición a la fase tardía) se observó que HMGB1 se relocalizó a los CR, se podría sugerir que las RMI podrían ser alguno de estos dominios nucleares, o incluso algún otro dominio no descrito. Por lo tanto, se necesitan hacer más experimentos para determinar la identidad de las RMI, primeramente, viendo la localización de HMGB1 con alguna proteína que sirva como marcador para cada uno de ellos y así determinar si es un dominio nuclear.

Por otro lado, es interesante que la redistribución de HMGB1 tanto en presencia de glicirricina, como en la infección con HAdV en etapas tempranas de la infección (4 hpi), cuando el genoma viral entra al núcleo e inicia la expresión de los genes virales tempranos, tienen un efecto muy parecido, pues ambas condiciones invierten los valores normales de las distribuciones de HMGB1, provocando que haya más células sin RMI, incluso cuando ambas condiciones están presentes. Mientras que cuando ya está bien establecida la expresión de genes virales, y ocurre la transición a la fase tardía del ciclo de replicación del virus, la presencia de glicirricina no parece tener un efecto tan marcado como el de la infección con HAdV, pues la redistribución de HMGB1 en las células infectadas y tratadas con glicirricina, se parece más a las células que solo fueron infectadas, que a las células que solamente se trataron con glicirricina.

Ya que se conoce la morfología que debería de tener DBP en los distintos tiempos postinfección en los que probamos, se decidió que sería importante cuantificar las células en las que DBP forma CR. De este modo pudimos observar que HMGB1 estuvo presente en los CR en todos los tiempos tardíos en los que se probó, desde que los CR tienen forma de puntos pequeños, hasta que se fusionan y forman anillos u otras estructuras más complejas, morfologías que están ligadas a los distintos pasos del ciclo de replicación del virus. Además, cabe la posibilidad de que a 4 hpi también hubiera HMGB1 en los CR, lo que podría determinarse usando alguna proteína viral como marcador de los CR en una etapa temprana, como por ejemplo E1B o E4Orf6. Interesantemente, se observó que el tratamiento con glicirricina en las células infectadas afectó la formación de los CR dependiendo del tiempo en el

que se analizó, pues a 16 y 36 hpi disminuyó, y en 24 aumentó ligeramente, por lo tanto se sugiere que HMGB1 podría estar implicada en la formación o estabilidad de los compartimentos de replicación.

Para intentar tener un mayor acercamiento sobre la colocalización entre HMGB1 y DBP, se hizo un análisis de coeficiente de correlación de Pearson con las imágenes en las que se evaluó la localización de HMGB1. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, lo que podría deberse a las limitaciones que tiene la técnica de microscopía utilizada, ya que es epifluorescencia y carece de la resolución necesaria para este tipo de análisis, por lo tanto, se deberá analizar la colocalización de HMGB1 con DBP por otros métodos como microscopía confocal.

La producción de progenie viral se evaluó con células infectadas sometidas a distintos tiempos de tratamiento con glicirricina, los tiempos escogidos se eligieron en base a lo que sabemos sobre el ciclo de replicación del virus, y que se ilustran en la Figura 8. Sin embargo, los resultados obtenidos de la titulación de la progenie viral son difíciles de interpretar, pues el que se haya encontrado un menor título en los virus que provienen de células tratadas a partir de 4 y 24 hpi, nos podría indicar que HMGB1 está implicada en la transcripción de genes virales tempranos, o en la síntesis u organización del DNA viral recién sintetizado, respectivamente. Sin embargo, ya que se obtuvo una mayor producción de progenie en los virus a partir de las células que fueron tratadas con glicirricina desde las 0, 16, y 32 hpi no es posible llegar a alguna conclusión, ya que prácticamente se obtiene el efecto opuesto a 4 y 24 hpi, algo que no esperaríamos si tiempos más tempranos han mostrado tener un efecto de disminución de la progenie viral. Esto podría deberse a errores experimentales. Estos resultados provienen de un solo experimento, así que es necesario repetirlo para determinar si son reproducibles.

Para determinar la función de HMGB1 en el ciclo de replicación de HAAdV, se deberá además medir el nivel de la transcripción de genes virales al inhibir HMGB1 con glicirricina, ya que esta proteína funciona como un factor de la transcripción. También se podría evaluar si la inhibición de HMGB1 altera los componentes de los compartimentos de replicación, por ejemplo, midiendo las proteínas virales o

celulares que los conforman, ya que HMGB1 podría funcionar como un andamio para los CR. Además, dado que HMGB1 es una proteína que se une al DNA, sería interesante determinar si se une directamente al DNA viral, ya que el genoma de HAdV tiene muchas regiones ricas en ATs, y HMGB1 se une a regiones ricas en AT; así como también determinar si lo hace por sí sola, o por ejemplo, en conjunto con la proteína viral VII dentro de los CR, ya que como ha mostrado Avgousti et al., (2016) HMGB1 y VII interaccionan con el DNA celular.

## **9. CONCLUSIONES**

HMGB1 se localiza en una distribución punteada por todo el núcleo, que comúnmente está acompañada de RMI.

Tanto el tratamiento con glicirricina, como la infección con HAdV5 en la fase temprana del ciclo de replicación viral, inducen un cambio en la localización de HMGB1 de RMI a una distribución punteada por todo el núcleo (sin RMI).

La infección con HAdV5 induce la relocalización de HMGB1 a CR y RMI en la fase tardía del ciclo de replicación viral, aún en presencia de glicirricina.

HMGB1 puede estar distribuida tanto en RMI como en CR en una misma célula infectada.

La glicirricina afecta (positiva o negativamente) la formación de compartimentos de replicación.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Identificar si las RMI son un dominio nuclear ya reportado, o alguno no reportado.
- Estudiar la colocalización de HMGB1 y DBP por métodos con mayor resolución como microscopía confocal.
- Repetir los experimentos de localización de HMGB1 con un marcador para los CR tempranos.
- Repetir los experimentos de producción de progenie viral.



- Determinar la producción de DNA viral en presencia de glicirricina
- Medir la transcripción de genes virales cuando HMGB1 es inhibida con glicirricina.
- Determinar si HMGB1 interacciona directamente con el DNA viral.
- Analizar la composición de los CR al inhibir HMGB1 con glicirricina.

## 11. REFERENCIAS.

- Avgousti, D. C., Herrmann, C., Kulej, K., Pancholi, N. J., Sekulic, N., Petrescu, J., Molden, R. C., Blumenthal, D., Paris, A. J., Reyes, E. D., Ostapchuk, P., Hearing, P., Seeholzer, S. H., Worthen, G. S., Black, B. E., Garcia, B. A., & Weitzman, M. D. (2016). A core viral protein binds host nucleosomes to sequester immune danger signals. *Nature*, *535*(7610), 173-177.  
<https://doi.org/10.1038/nature18317>
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, *224*(3), 213-232.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Charman, M., & Weitzman, M. D. (2020). Replication Compartments of DNA Viruses in the Nucleus: Location, Location, Location. *Viruses*, *12*(2), 151.  
<https://doi.org/10.3390/v12020151>
- Chikhirzhina, E., Starkova, T., Beljajev, A., Polyanichko, A., & Tomilin, A. (2020). Functional Diversity of Non-Histone Chromosomal Protein HmgB1. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 7948.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21217948>

- Fiore, C., Eisenhut, M., Krausse, R., Ragazzi, E., Pellati, D., Armanini, D., & Bielenberg, J. (2008). Antiviral effects of Glycyrrhiza species. *Phytotherapy Research*, 22(2), 141-148. <https://doi.org/10.1002/ptr.2295>
- Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Skalka, A. M., & Enquist, L. W. (2015). *Principles of virology* (4th edition). ASM Press.
- Hidalgo, P., Anzures, L., Hernández-Mendoza, A., Guerrero, A., Wood, C. D., Valdés, M., Dobner, T., & Gonzalez, R. A. (2016). Morphological, Biochemical, and Functional Study of Viral Replication Compartments Isolated from Adenovirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 90(7), 3411-3427. <https://doi.org/10.1128/JVI.00033-16>
- Hidalgo, P., & Gonzalez, R. A. (2019). Formation of adenovirus DNA replication compartments. *FEBS Letters*, 593(24), 3518-3530. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13672>
- Hidalgo, P., & González, R. A. (2022). Adenoviruses. En *Encyclopedia of Infection and Immunity* (pp. 59-66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00066-5>
- Huan, C., Xu, Y., Zhang, W., Guo, T., Pan, H., & Gao, S. (2021). Research Progress on the Antiviral Activity of Glycyrrhizin and its Derivatives in Licorice. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 680674. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.680674>
- King, C. R., Tessier, T. M., & Mymryk, J. S. (2016). Color Me Infected: Painting Cellular Chromatin with a Viral Histone Mimic. *Trends in Microbiology*, 24(10), 774-776. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.08.005>

- Lynch, K. L., Dillon, M. R., Bat-Erdene, M., Lewis, H. C., Kaai, R. J., Arnold, E. A., & Avgousti, D. C. (2021). A viral histone-like protein exploits antagonism between linker histones and HMGB proteins to obstruct the cell cycle. *Current Biology*, 31(23), 5227-5237.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.09.050>
- Mollica, L., De Marchis, F., Spitaleri, A., Dallacosta, C., Pennacchini, D., Zamai, M., Agresti, A., Trisciuglio, L., Musco, G., & Bianchi, M. E. (2007). Glycyrrhizin Binds to High-Mobility Group Box 1 Protein and Inhibits Its Cytokine Activities. *Chemistry & Biology*, 14(4), 431-441.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.03.007>
- Nakagami, H. (2021). Development of COVID-19 vaccines utilizing gene therapy technology. *International Immunology*, 33(10), 521-527.  
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxab013>
- Pied, N., & Wodrich, H. (2019). Imaging the adenovirus infection cycle. *FEBS Letters*, 593(24), 3419-3448. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13690>
- Schmid, M., Speiseder, T., Dobner, T., & Gonzalez, R. A. (2014). DNA Virus Replication Compartments. *Journal of Virology*, 88(3), 1404-1420.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02046-13>
- Tang, Z., Zang, N., Fu, Y., Ye, Z., Chen, S., Mo, S., Ren, L., & Liu, E. (2018). HMGB1 mediates HAdV-7 infection-induced pulmonary inflammation in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(1), 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.145>
- van de Sand, L., Bormann, M., Alt, M., Schipper, L., Heilingloh, C. S., Steinmann, E., Todt, D., Dittmer, U., Elsner, C., Witzke, O., & Krawczyk, A. (2021).

Glycyrrhizin Effectively Inhibits SARS-CoV-2 Replication by Inhibiting the Viral Main Protease. *Viruses*, 13(4), 609. <https://doi.org/10.3390/v13040609>

Wolkerstorfer, A., Kurz, H., Bachhofner, N., & Szolar, O. H. J. (2009). Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Research*, 83(2), 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.04.012>

## 12. ANEXOS.

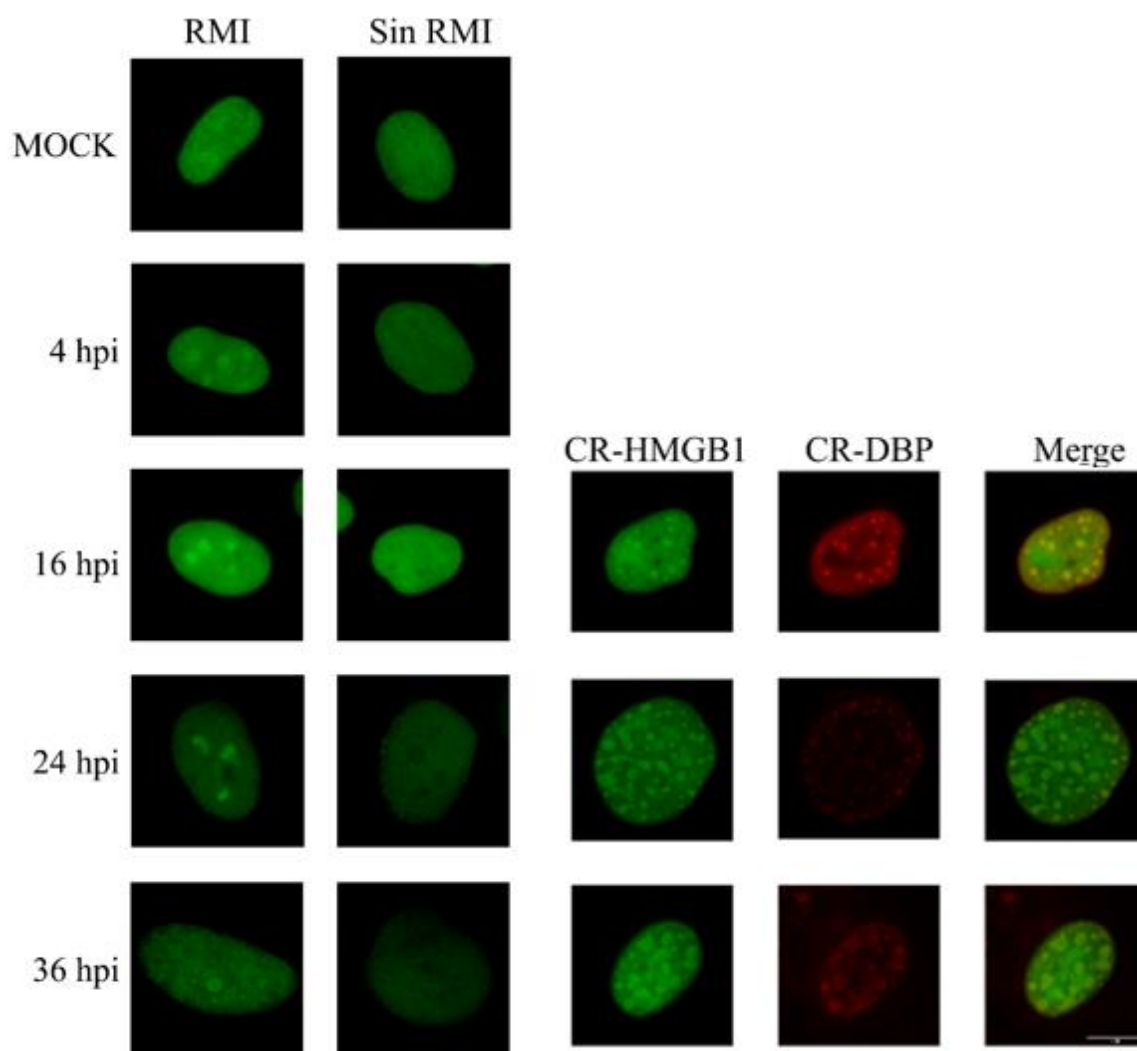


Figura A1. Localización de HMGB1 en células infectadas con HAdV5, sin modificación de intensidad de DBP.

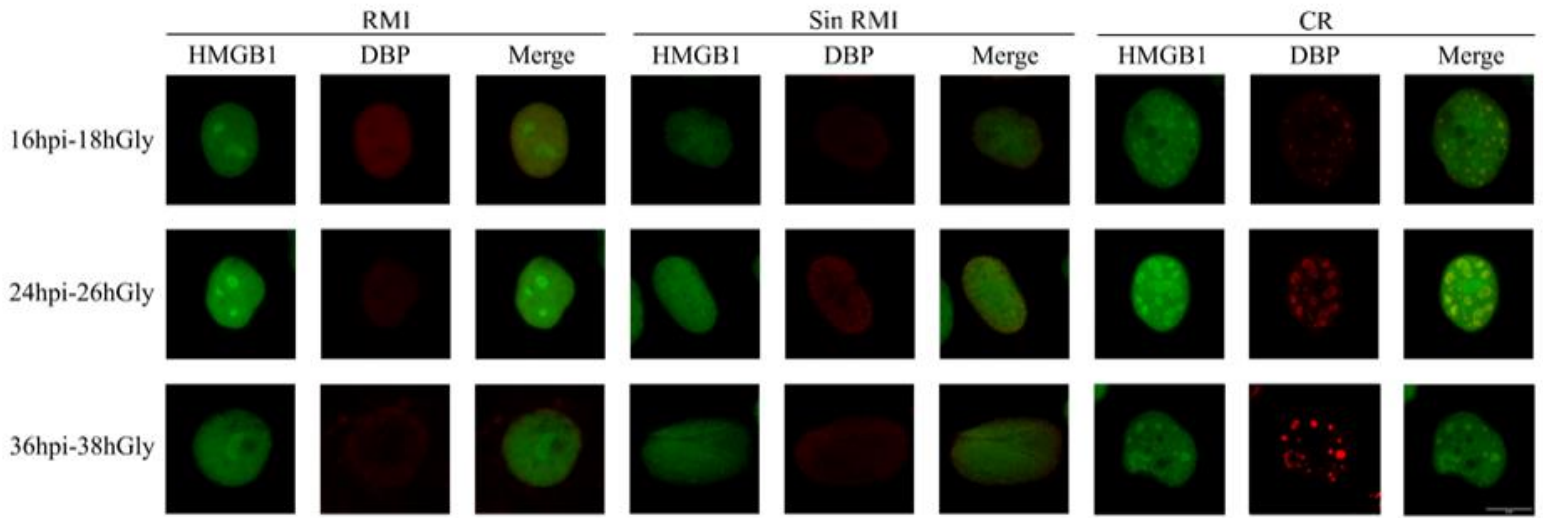


Figura A2. Localización de HMGB1 en células infectadas con HAdV5 y tratadas con glicirricina, sin modificación de intensidad de DBP



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **UGALDE SANTIAGO YAZMIN** con número de matrícula **10002766** cuyo título es:

**“Efecto de la inhibición de HMGB1 sobre la eficiencia de replicación del adenovirus humano tipo 5”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS CON AREA TERMINAL BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 27 de abril del 2023

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA**  
**DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA**  
**DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE**  
**DRA. SONIA DÁVILA RAMOS**  
**DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO**

**(Presidente)**  
**(Secretario)**  
**(Vocal)**  
**(Suplente)**  
**(Suplente).**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2023-04-27 15:20:39 | Firmante**

h/EPYKjozJ0IHB+TBdLnktQYFvXHWBvKSXyA9JJOXFKTyWOogaEdzFE4jB0v4VRM1nvyL7KE8tHnkmHsGqVJSLijEe0IFZEI9UvJRew81OTQFSW7S5XSLcT3XaOnQ6D7mLBoltV+pgZSR7x1ySZRI3DgzDfhV0g3k1SMwYLoBVee/wAvEzOhmCZPtFZwQG04HXR4lvjPMJPSijsNSA6/OkCHtlujk2hLNGQsZNDdKCUqc7LR6DtNgNct4WGD4UxX4cZ6+bUglV/KxNinoYACNUhqjmnM0hcZ1x1f1DViYxJyxsm2WCCaRXD3XDx5y/zz8blxaWSbO6zaC4QsIsA==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2023-04-27 15:36:10 | Firmante**

fla96TMhyA7GwP6zfu0eg/Gtp0+I+fYI5VtWePRvZ/SY5KT+/7/z9+byT652wG00koT/CJec4O0e2/+rBz2A8/l6q2ueLnGbJR133TCRn96hdP03hv0/F+RmhnViU1RX2hgyH5tB03eqazcai0k1blCRhAlHNtQx9eC176XwKOy6n3d2Q/dy+17Hh9tzaU8cO0QuJADbeuTJXJwa9SD596gq/MpSHIK1XYVWwTZsyQfyyRmnn5W8djh8f3LZkz8nwSshpl6yPse6rOpZukaDgBO+c6o4fvaY6cd5YoHmyXOmvp5dNRgzhBCIkAlG+Kmyi8CbtI8cpJOMe769nfcJ2A==

**SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2023-04-28 04:14:24 | Firmante**

iCzkeXntIPF2+c3gmRGoQHk4Pf3gliQKqVxs3GK8gkzZQ9adOW5Sg4UzBXGAVnrmbSgqfMSHv2osJiz96YhWidpCmWWudHiW3rndPdqrjLviZc4haXhpzh2GLTJDUTE4K6GBnjnE+SHmC95lhPxCW4iSMIsxG/qYYDaHDGgocg8YCLITG+ycSvFL+7XphArvEBnfz1MMkxx7O4ZW9g6qTdjhmezeTZ71drMwL10KphS3zWc/aF/LxoDdcG3R/oOB7xepTmD4OkC27Vn7Lk1UEWW4212b6iQ5oOZd0Lnbfn25jbBZwfaYb0o6N7jXODJFTiYHFoq7+UpzZeXpZaMlw==

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-05-01 21:42:50 | Firmante**

AlaPE43fXSt/ue3nEjUdbelUharGk/7oCQckH5JcU1bG+3+Bq0KQgmjM01gRTzhOaWI92JTIsF4UqofxeBoO2X2usYoPnbN85k7VII8YDABZTiA4bBcQUtYhLvPUzVVB5OZJPO37a1SPWF1xajbp+5MHN7xC/5WjHJm/O+qvUGj15AN07j2O9xFYtdONX8Rj2Fy6PTW+dRAGniw250iy3Ar2AaMnfv+NbSy9DBniPqfDD2Su5SUUs4G2h4sop/5mVPTRCILA3jYq0cfd4WPw2ijrjLvxabOsqmc2T2vZH7tGUA9xQogAq0fw5PdwTlWLoKi0Tw6lou685tO3g==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2023-05-03 13:15:59 | Firmante**

J3D674ZVTul+smlN9O+qxZlfnBS+6eOgSZoAWOAhSwXrqbqJAhUJN/EsVvcPH2mtY8RikT66OEFbTlZPcVm+W4iv2wTZCrlsyzSlm2UJp/eCdzStiY4EpZN2sky+1vmJGz7wEM0Pcrl/a+d7s3+zsonLa8njYr4F7LGMylgVbLbEsyPUn5fzJO3NsjU/72xco3krR+3h/Jel+g22B9yWJN5w55LxcOY3Lb5JEX5VIP1ajPuy6JcuvGb95lpLodKKX0E40vurccix6KMIUA1euqsuQwJNRUfVwwSjnalDhFvblxjsGA2ckbTIK5+TkDorWgC6aYvVaVMMxwQdw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**K2QHduOk**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gKmfNziYwhDjvWxgqVXG9i5R7cJeNfh3>

