



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Rol de la proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) en la respuesta antiviral

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA
Opción: Biología Molecular y Celular

Lic. Natalia Ansin

*Tutor: Dr. Nicolás Sarute
Laboratorio de Interacciones Virus-Célula
Institut Pasteur Montevideo*





UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Rol de la proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) en la respuesta antiviral

Lic. Natalia Larisa Ansin Rando

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Ciencias Biológicas, opción Biología Celular y Molecular.

Director:

Dr. Nicolás Sarute

Tribunal:

Dra. Natalia Echeverría

Dra. Ana Eugenia Marandino

Dra. Natalia Olivero

28 de octubre de 2024

Montevideo

Uruguay

ÍNDICE

1. Resumen.....	6
2. Abstract.....	7
3. Abreviaturas.....	8
4. Introducción.....	10
4.1 Virus emergentes y re-emergentes, un problema para la salud pública global	
4.2 Respuesta inmune innata en infecciones virales	
4.3 Proteína reguladora de señales alfa (SIRPA)	
5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos específicos	
6. Materiales y Métodos.....	22
6.1 Líneas celulares	
6.2 Macrófagos primarios derivados de medula ósea de ratón (BMDM)	
6.3 Virus	
6.4 Titulación viral	
6.5 Silenciamiento de la expresión (<i>knockdown</i>) mediante RNA interferentes pequeños	
6.6 Aislamiento de RNA y RT-qPCR	
6.7 Infecciones in vitro	
6.8 Análisis del estado metabólico celular por Agilent Seahorse XF	
6.9 Generación de partículas lentivirales SIRPA-GFP	
6.10 Estimulaciones con moléculas agonistas de RLRs	
6.11 Ensayos de inhibición de la familia de quinasas Scr (SFK) y fosfatasa SHP-1	
6.12 Citometría de flujo (FACS)	
6.13 Western Blot	
6.14 Inmunoprecipitación	
6.15 Generación de líneas celulares SIRPA <i>knockout</i> (Sirpa KO)	
6.16 Análisis estadísticos	
7. Resultados.....	33
7.1 SIRPA es un factor de restricción viral activo contra varias familias de virus endocíticos	
7.2 Análisis de parámetros metabólicos en células SIRPA <i>knockdown</i>	
7.3 Establecimiento de líneas celulares con expresión estable de SIRPA fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) para analizar la entrada viral por microscopía confocal	
7.4 SIRPA regula negativamente la inmunidad autónoma celular frente a infecciones virales	
7.5 La señalización negativa de SIRPA en la respuesta de IFN- α no involucra al receptor citosólico RIG-I	
7.6 La señalización mediada por SIRPA no regula la producción de citoquinas inflamatorias ni el fenotipo de macrófagos bajo condiciones inflamatorias e infección viral	

7.7 Las quinasas Src fosforilan a SIRPA durante la invasión viral, independientemente de su interacción con CD47, y regulan su actividad antiviral e inmunomoduladora	
7.8 La expresión de SIRPA aumenta ante infecciones virales y estímulos inflamatorios, pero no es inducida por interferón del tipo I/II	
7.9 Generación y validación de líneas celulares humanas SIRPA <i>knockout</i>	
8. Discusión	51
9. Conclusión y Perspectivas	57
10. Referencias	59
11. Anexo	70
11.1 Estudio del metabolismo de células SIRPA KD y CTRL en el Agilent Seahorse®	
11.2 Silenciamiento de genes mediante RNA pequeño de interferencia (siRNA) utilizando el reactivo RNAiMax (Thermo)	
11.3 Aislamiento de RNA total de células con el kit Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek)	
11.4 Reacción de retrotranscripción (RT)	
11.5 Reacción de PCR cuantitativa (qPCR)	
11.6 Transfección de plásmidos utilizando el reactivo Lipofectamine 3000 (Thermo): formato de placa de 6 pocillos	

AGRADECIMIENTOS

RECONOCIMIENTOS PROFESIONALES

- Al Laboratorio de evolución experimental de virus (LEEV) dirigido por el Dr. Gonzalo Moratorio por facilitarnos el virus Mayaro.
- A la Dra. Meghan Morrisey de la Universidad de California en Santa Barbara, EEUU por brindarnos el constructo SIRPA-GFP.
- Al *Virus Sensing and Signaling Unit* del Institut Pasteur dirigido por la Dra. Nolwenn Jouvenet por supervisar mi pasantía de investigación, y al Dr. Vincent Caval por su mentoría en la generación células SIRPA knockout por la técnica de CRISPR-Cas9.
- Al laboratorio de Patologías del metabolismo y envejecimiento dirigido por el Dr. Carlos Escande y al Dr. Jorge Rodríguez por su mentoría en los ensayos de metabolismo con el equipo Agilent Seahorse.
- A la Dra. Yanina Panzera y a la Sección Genética de Facultad de Ciencias (UdelaR), por permitirnos trabajar en su laboratorio BSL-2. Sin ellos esta tesis no hubiese sido igual.
- A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la Beca CAP
- Al Departamento de Inmunobiología de la Facultad de Medicina (UdelaR) del que fui docente grado 1 estos últimos 4 años.
- A las correctoras y tribunal de esta tesis, por su tiempo y dedicación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Tendría que hacer una tesis entera para los agradecimientos...

AL LIVC

A mi tutor, el Dr. Nicolás Sarute, por su mentoría a lo largo de la maestría. Agradezco lo que me enseñó, no sólo a nivel teórico-práctico, si no a nivel profesional y emocional. Agradezco sus cuidados a todo el laboratorio, y con el cariño con el que nos motiva cuando estamos frustrados; por su paciencia y su apoyo; por el esfuerzo que ha hecho para que tengamos las mejores condiciones de investigación posibles y su esfuerzo para tener el ambiente laboral tan lindo que tenemos; por las numerosas oportunidades que me ha brindado y por impulsarme a crecer. Y claro que a todo el LIVC, al Ing. Mati, por su año compartido, a la Dra. Kathi, por su apoyo emocional y su ayuda con muchos experimentos, a la futura Ing. Paz, por compartir conmigo la investigación en inmunología y hacer los experimentos más divertidos y a la futura Lic. Cami por su ayuda en muchos experimentos y por su gran disposición y alegría.
¡Y a todo el laboratorio por la paciencia que me tienen y aguantar mis locuras!

A MI FAMILIA

A mi casi casi esposo Leandro por todo su apoyo y amor. A mi mamá, Karina y mi papá Gerardo, por siempre estar ahí y su cariño. A mi hermano y compañero en la ciencia Andrés, a quien admiro. A mi hermana Mica por ser parte de esta familia. A mis abuelos Antonio, Ana, Heber, Martha y Juan, por su cuidado y amor. A mis suegros Clarita y Hetitor y cuñados Yazmin y Mathías. A todos mis tíos y primos, por cada alegría.

A MIS AMIGOS

Que siempre le agregan la cuota de risa a la vida.

¡GRACIAS!

1. RESUMEN

La proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) (del inglés *signal regulatory protein alpha*) es una glicoproteína transmembrana altamente expresada en las células mieloides, que al unirse a la proteína de membrana CD47 se fosforila, iniciando una cascada de señalización negativa que finalmente inhibe la fagocitosis y regula negativamente las respuestas inmunitarias. Aunque la función de SIRPA se ha estudiado ampliamente en el cáncer y las enfermedades autoinmunes, recién estamos comenzando a apreciar su papel en las enfermedades infecciosas. Anteriormente demostramos que SIRPA limita la internalización de virus ARN patogénicos no relacionados, incluidos flavivirus (virus Zika (ZIKV)), arenavirus (virus Junín (JUNV), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Tacaribe (TCRV)) y rhabdovirus (virus de la estomatitis vesicular (VSV)) así como de pseudovirus que portan las glicoproteínas del coronavirus SARS-CoV-2 y del filovirus Ébola. En esta tesis, demostramos que SIRPA es antiviral contra otro flavivirus, el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el togavirus Mayaro (MAYV). También descubrimos que la infección viral temprana desencadena la fosforilación de tirosina de SIRPA por las quinasas de la familia Src (SFks) (del inglés *Src family kinases*), mediante un mecanismo independiente de su interacción con CD47. Además, describimos por primera vez que SIRPA regula la respuesta autónoma celular frente a infecciones por MAYV, JUNV y ZIKV. Estos resultados sugieren que la actividad de SIRPA podría explotarse para desarrollar nuevas terapias antivirales e inmunomoduladoras.

2. ABSTRACT

Signal-regulatory protein alpha (SIRPA) is a transmembrane glycoprotein highly expressed in myeloid cells, which upon binding to the membrane protein CD47, undergoes tyrosine phosphorylation to initiate a negative signaling cascade that ultimately inhibits phagocytosis and downregulates immune responses. Although the function of SIRPA has been extensively studied in cancer and autoimmune diseases, we are only beginning to understand its role in infectious diseases. Previously, we demonstrated that SIRPA limits entry of pathogenic RNA viruses from divergent families, including flaviviruses (Zika virus (ZIKV)), arenaviruses (Junín virus (JUNV), lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), Tacaribe virus (TCRV)), and rhabdoviruses (vesicular stomatitis virus (VSV)), as well as pseudoviruses expressing the surface glycoproteins of the coronavirus SARS-CoV-2 and the filovirus Ebola. In this thesis, we demonstrate that SIRPA has antiviral activity against another flavivirus, Yellow Fever virus (YFV), and the togavirus Mayaro virus (MAYV). We also discovered that viral invasion triggers tyrosine phosphorylation of SIRPA by Src family kinases (SFKs) through a mechanism independent of its interaction with CD47. Additionally, we describe for the first time that SIRPA regulates the cell-autonomous response to MAYV, JUNV, and ZIKV infections. These results suggest that SIRPA activity could be exploited to develop new antiviral and immunomodulatory therapies.

3. ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
AP1	Activador de proteína 1
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea (por sus siglas en inglés, Bone Marrow-Derived Macrophages)
CD86	Cluster of Differentiation 86
DAMPs	Moléculas asociadas a daño
DENV	Virus del Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido, utilizado como vehículo de control
ECAR	Tasa de acidificación extracelular
FCCP	Carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona
GFP	Proteína verde fluorescente
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
IFN	Interferón
IFN- α 2	Interferón alfa 2
IFN- β	Interferón beta
IFN- γ	Interferón gamma
ISG	Genes estimulados por interferón
IRAK-4	Quinasa-4 asociada al receptor de IL-1
IRF	Factor regulador del interferón
JUNV	Virus Junín
JUNV-C1	Cepa vacunal C1 del virus Junín
KD	<i>Knockdown</i>
KO	<i>Knockout</i>
LGP2	Laboratorio de genética y fisiología 2
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAPK	Familia de quinasas activadas por mitógenos
MAVS	Proteína adaptadora mitocondrial para la señalización antiviral
MAYV	Virus de Mayaro
MDA5	Gen asociado a la diferenciación del melanoma
MOI	Multiplicidad de infección
MyD88	Proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NP	Nucleoproteína
PAMPs	Moléculas asociadas a patógenos (por sus siglas en inglés, Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RIG-I	Gen de inducción por ácido retinoico-I

RLR	Receptores tipo RIG-I
siCTRL	RNA de interferencia de control
siRNA	RNA de interferencia pequeño
SHP	Fosfatasa de tirosina con dominio de homología a SH2
SIRPA	Proteína reguladora de señales alfa
SFKs	Quinasas de la familia Src
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
TIR	Dominio Toll/IL-1 β involucrado en señalización
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIF	Adaptador de señalización TIR
WB	Western Blot
WT	Wild type
YFV	Virus de la fiebre amarilla
YFV-17D	Cepa vacunal 17D del virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus del Zika

4. INTRODUCCIÓN

4.1 *Virus emergentes y re-emergentes, un problema para la salud pública global*

Las últimas décadas se han caracterizado por la emergencia y re-emergencia de virus causantes de grandes epidemias, como la epidemia del SARS durante 2002-2004 en Asia, la pandemia de Influenza A H1N1 durante 2009-2010, las epidemias de Ébola durante 2013-2016 en África y la epidemia de Zika en las Américas en 2015-2016, entre otras, culminando con la pandemia de COVID-19 que se extendió por más de 3 años a nivel mundial (Roychoudhury et al., 2020). Dichas epidemias demuestran la amenaza que representan los virus emergentes para la salud pública mundial y los efectos devastadores que pueden tener a nivel social y económico. Los efectos de estas epidemias virales se agravan en países subdesarrollados y en vías de desarrollo los cuales son más vulnerables debido a distintos factores, incluidos factores geográficos, demográficos y socioeconómicos (Boutayeb et al., 2010). Para prevenir, evitar, y controlar futuras epidemias virales, nuestros esfuerzos deben estar dirigidos a la vigilancia y detección de brotes epidemiológicos incipientes, pero también al desarrollo de nuevas medidas profilácticas y terapéuticas para evitar la circulación comunitaria de estos virus en poblaciones humanas, dado que en la actualidad no existen vacunas ni antivirales efectivos contra la mayoría de los virus circulantes en las Américas.

Nuestro grupo trabaja con tres familias de virus zoonóticos ampliamente distribuidos en Latinoamérica: *Arenaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*. Los arenavirus son una familia de virus envueltos con genoma de ARN bi-segmentado y de polaridad negativa, que son transmitidos a humanos mayoritariamente por roedores silvestres (Radoshitzky et al., 2019). Los arenavirus patogénicos Junín, Machupo, Lassa, entre otros, causan fiebre hemorrágica severa y son responsables de brotes infecciosos/epidemias frecuentes en Sudamérica y África (Radoshitzky et al., 2019). Debido a su alta patogenicidad, el trabajo con estas cepas se restringe a laboratorios con máximos niveles de bioseguridad y contingencia (BSL-4). Sin embargo, es posible trabajar con sistemas sustitutos de estos virus (pseudovirus o *virus-like particles*) o utilizar cepas no patogénicas o de baja patogenicidad

en laboratorios de bioseguridad nivel 2 (BSL-2). Los arenavirus del Nuevo Mundo (ANM), causantes de fiebres hemorrágicas, se han identificado en varios países de Latinoamérica (Radoshitzky et al., 2019) (Figura 1). Si bien la mayoría de los brotes de arenavirus están asociados al contacto de humanos con los reservorios roedores en su área endémica, cambios recientes en la ecología y en el rango de hábitat de estos roedores ponen en riesgo a poblaciones en regiones geográficas distantes (Clegg et al., 2009).

Los flavivirus son virus envueltos con genoma de ARN lineal y de polaridad positiva, que son transmitidos por mosquitos del género *Aedes* (Pan et al., 2022). Debido a la amplia distribución de sus vectores de transmisión, los brotes infecciosos por virus de la familia *Flaviviridae*, como el virus Zika (ZIKV), el virus Dengue (DENV) o el virus de la fiebre amarilla (YFV) se distribuyen a lo largo de los continentes (Figura 1). DENV es el agente etiológico de la fiebre Dengue y Dengue grave, y es el flavivirus de mayor transmisión a nivel mundial presente en más de 125 países tropicales y subtropicales de las Américas, Asia y África (Roy et al., 2021). ZIKV es el agente causal de la Fiebre del Zika y está actualmente distribuido en 87 países de las Américas, Asia y África (Dahiya et al., 2023). Si bien el DENV puede causar fiebre hemorrágica y la infección por ZIKV se asocia a complicaciones neurológicas, es posible trabajar con ambos virus en condiciones BSL-2. Por su parte, YFV es un virus causante de fiebre hemorrágica endémico en las regiones tropicales de África y América del Sur (Dutta et al., 2023). Si bien el trabajo con este patógeno se restringe a laboratorios BSL-3, la cepa vacunal atenuada de YFV (17D), la única vacuna que se considera segura y eficaz para flavivirus puede ser manipulada bajo condiciones de BSL-2.

Otros virus emergentes de importancia para la salud pública son los togavirus del género *Alphavirus*, incluyendo a Chikungunya (CHIKV) y Mayaro (MAYV) los cuales son transmitidos por mosquitos y causan tanto brotes focales como grandes epidemias (Powers et al., 2010), especialmente en el continente americano, África y el sur de Asia (de Lima Cavalcanti et al., 2022; Acosta-Ampudia et al., 2018) (Figura 1). Los togavirus son virus envueltos de genoma de ARN de cadena lineal simple y polaridad positiva (Powers et al., 2010). MAYV es un virus enzoótico que circula activamente entre diferentes especies animales; sin embargo, durante los últimos años se ha registrado un aumento sostenido de

casos de enfermedad febril causado por MAYV en distintas poblaciones de las Américas (Acosta-Ampudia et al., 2018), sugiriendo que podría ser responsable próximamente de epidemias en el continente (Silva-Ramos et al., 2023). En la mayoría de los casos, la enfermedad por MAYV es inespecífica, leve y autolimitada, sin embargo, los casos de fiebre severa pueden presentar manifestaciones artríticas o encefálicas y se asocia con tasas de morbilidad y/o mortalidades elevadas (Azar et al., 2020). Por su parte, los casos graves de CHIKV presentan cuadros de artralgia grave y complicaciones neurológicas, como encefalitis, meningitis y síndrome de Guillain-Barré, por lo que este patógeno debe ser estudiado en condiciones BLS-3; sin embargo, MAYV puede manipularse en laboratorios BSL-2 (Chuong et al., 2019). Desafortunadamente, no existen vacunas ni medidas terapéuticas aprobadas contra MAYV o CHIKV para su uso en la actualidad (Azar et al., 2020).

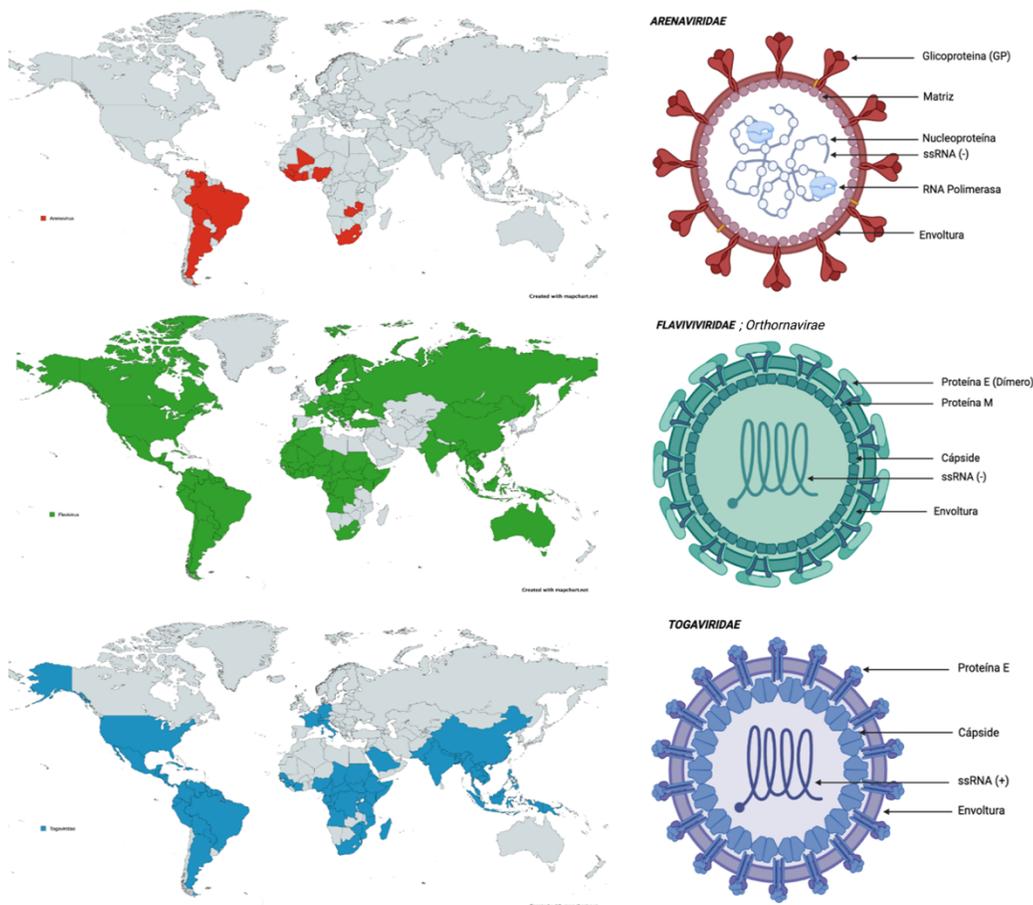


Figura 1. Distribución global y estructura de los viriones de las familias *Arenaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*. Creado en Biorender®

4.2 Respuesta inmune innata en infecciones virales

Inmediatamente tras una infección viral, el sistema inmune innato activa y orquesta una serie de mecanismos de defensa con el fin de disminuir la replicación viral y su diseminación, y eliminar a las células infectadas (Sun et al., 2010). La inmunidad intrínseca está mediada por proteínas expresadas constitutivamente por la célula, capaces de bloquear directamente distintas etapas del ciclo replicativo viral, incluyendo el ingreso a las células, replicación/transcripción, brotamiento, entre otras (Rai et al., 2021; Majoul y Compton, 2022). La respuesta autónoma es iniciada por la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (del inglés *pattern recognition receptors*), los cuales son receptores codificados en la línea germinal que reconocen moléculas asociadas a patógenos (PAMPs) (del inglés *pathogen associated molecular patterns*) y moléculas asociadas a daño (DAMPs) (del inglés *danger associated molecular patterns*) generadas durante la infección (Turner et al., 2014). Los PAMPs virales son moléculas conservadas a lo largo de la evolución e incluyen proteínas estructurales, carbohidratos y ácidos nucleicos (Chan et al., 2016).

Los PRRs se pueden dividir en receptores de membrana (plasmática o endosomal) y receptores citosólicos. Los receptores de membrana, como los receptores tipo Toll (TLR) (del inglés *toll like receptor*), son expresados predominantemente por células involucradas en la respuesta inmune innata tales como macrófagos, células dendríticas y epiteliales (Chan et al., 2016). Los TLR tienen un ectodominio rico en leucina y un dominio citoplasmático Toll/IL-1 β (TIR) (del inglés *toll-interleukin-1 receptor*) involucrado en la señalización subcelular (Nazmi et al., 2014). La proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (del inglés *Myeloid differentiation primary response 88*) media la señalización de todos los TLRs, a excepción del TLR3, la cual utiliza la proteína adaptadora con dominios TIR inductora de interferón beta (TRIF) (del inglés *Toll/interleukin-1 receptor-domain-containing adapter protein inducing interferon beta*) (Kawasaki et al., 2014). El TLR4 es el único receptor capaz de señalizar por MyD88 y TRIF (Kawasaki et al., 2014). Se pueden resumir tres principales ejes de señalización de los TLRs (Figura 2). Tras la estimulación con ligandos, la proteína adaptadora MyD88 recluta a la quinasa-4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-4) (del inglés *interlukine-1 receptor associated kinase 4*) la cual se

activa y se asocia con el factor asociado al receptor de TNF- α (TRAF) (del inglés *TNF receptor associated factors*) TRAF6, activando así el complejo I κ B quinasa (IKK) (del inglés *I κ B kinase*) y el factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (del inglés *nuclear factor-kappa B*). En el segundo eje, IRAK/TRAF6 activan a las proteína cinasa activada por mitógenos MAPK (del inglés *Mitogen-activated protein kinase*) quinasas (JNK, p38, ERK) culminando en la activación de los factores de transcripción AP1 y CREB. Finalmente, la proteína adaptadora TRIF media la activación de IKK por TRAF3 o TRAF6 independiente a IRAK, lo que lleva a la activación de los factores 3 y 7 de regulación del interferón (IRF3, IRF7) (del inglés *interferon regulatory factor*) (Kawasaki et al., 2014; Duan et al., 2022).

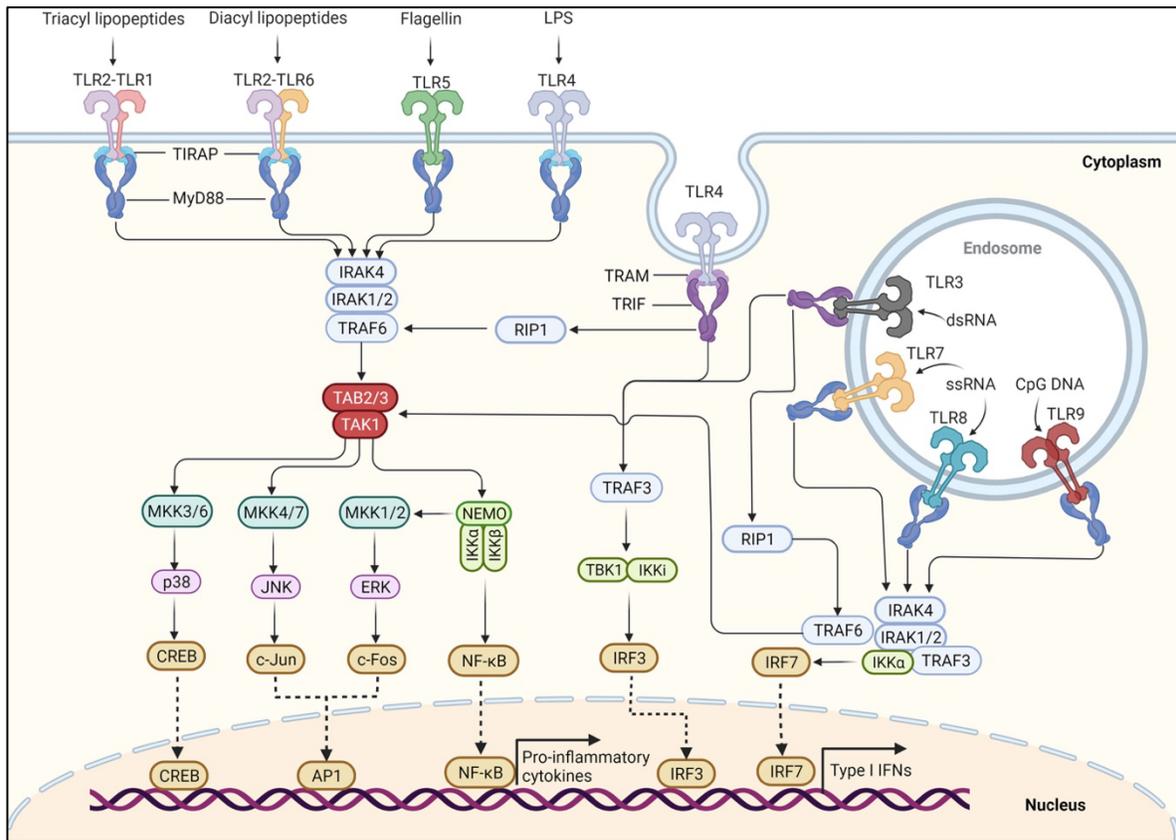


Figura 2. Señalización celular mediada por receptores TLR. Los ligandos de TLRs promueven su señalización mediada por las proteínas adaptadoras MyD88 o TRIF, las cuales desencadenan cascadas de activación subcelular que culminan en la activación de los factores de transcripción involucrados en la expresión de genes inflamatorios, citoquinas e interferones. Imagen tomada de Duan et al., 2022.

En el contexto de infecciones virales, el RNA genómico de cadena simple (ssRNA) (del inglés *single-stranded RNA*) y el RNA de doble cadena (dsRNA) (del inglés *double-stranded RNA*) generado transitoriamente durante la replicación viral son reconocidos por los receptores TLR7/8 y TLR3, respectivamente, activando respuestas innatas antivirales. La activación de estos receptores se ha documentado para las familias *Flaviviridae* (Nazmi et al., 2014), *Arenaviridae* (Borrow et al., 2010) y *Togaviridae* (Carpentier et al., 2018). Por otra parte, los receptores TLR-2 y TLR-4 también están involucrados en la respuesta inmune innata contra flavivirus (Nazmi et al., 2014; Aguilar-Briseño et al., 2020), arenavirus (Lee et al., 2009; Nazmi et al., 2014; Macal et al., 2017; Stott et al., 2020) y togavirus (Valdés-López et al., 2022; Mahish et al., 2023), mediante la detección de glicoproteínas (GP) y proteínas de envoltura (E) virales a nivel de la membrana plasmática.

Los virus de ARN que se replican en complejos citoplasmáticos poseen modificaciones o estructuras en el ARN capaces de ser reconocidas por los PRRs citosólicos, tales como la presencia de 5'- trifosfato en el ARN genómico viral de cadena simple (ssRNA) y los intermediarios de replicación ARN doble cadena (dsRNA). Los receptores citosólicos, como los receptores tipo NOD (NLR) (del inglés *Nod-like receptor*), receptores tipo RIG-I (RLR) (del inglés *Rig-I-like receptor*) y los receptores GMP-APM cíclico sintasa (cGAS) (del inglés *cyclic GMP-AMP synthase*), son expresados por todas las células nucleadas de mamíferos (Chan et al., 2016). Los RLRs RIG-I y MDA5 poseen dos dominios reclutadores de caspasas (CARDs) (del inglés *Caspase recruitment domains*), un dominio helicasa/ATPasa y un dominio C terminal implicado en el reconocimiento de dsRNA (Nazmi et al., 2014) (Figura 3). La proteína adaptadora MAVS activa a las proteínas quinasas IKK, las cuales activan a los factores de transcripción NF- κ B, IRF3 e IRF7 (Zeng et al., 2010).

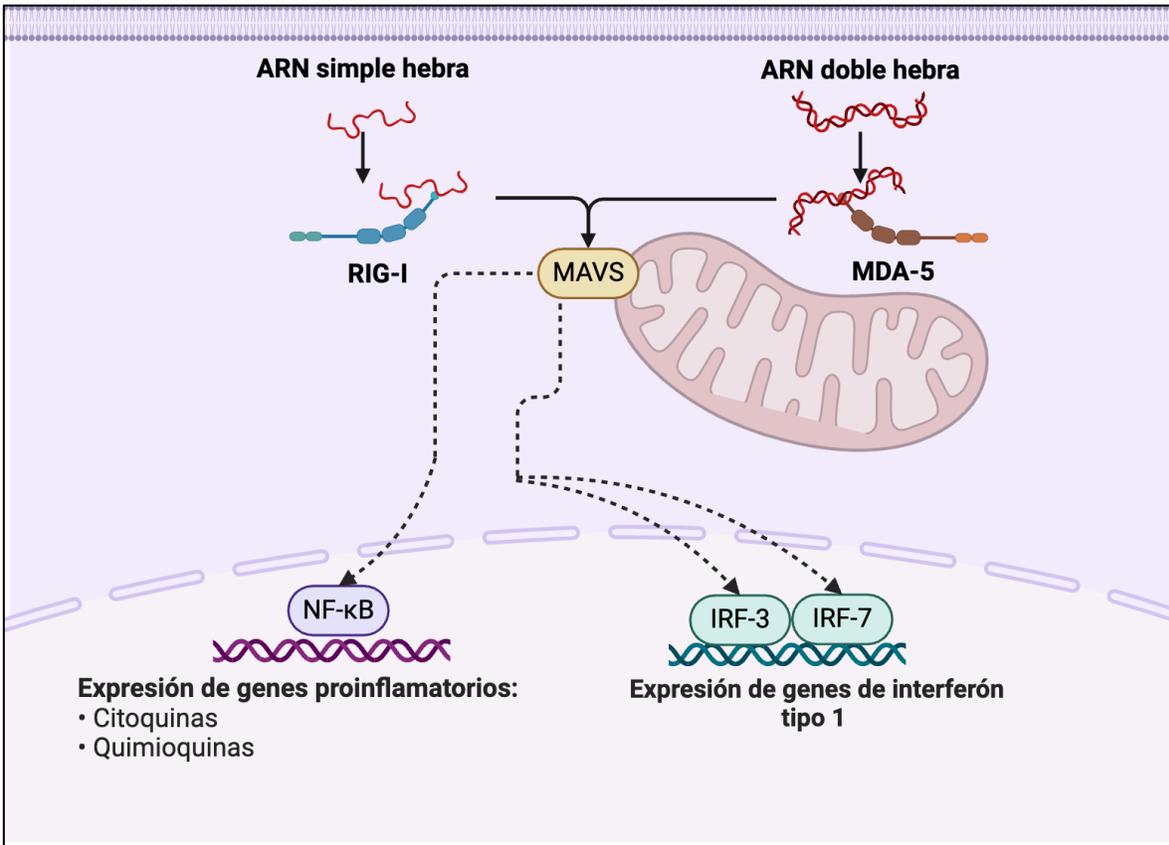


Figura 3. Señalización celular mediada por receptores RLR (MDA5 y RIG-I). En infecciones por virus ARN, los RLR reconocen ARN genómico viral de cadena simple (ssRNA) y los intermediarios de replicación ARN doble cadena (dsRNA). Imagen creada en biorender ®

El denominador común tras la señalización de los PRRs es la activación de factores de transcripción que, al migrar al núcleo, promueven la expresión de citoquinas inflamatorias e interferones. En células infectadas, estas moléculas no sólo contienen rápidamente la infección al inhibir la replicación y el ensamblaje viral, sino que también desempeñan un papel crucial en la activación del sistema inmunológico adaptativo para eliminar la infección. En particular, elementos de la inmunidad autónoma celular proporcionan la primera línea de defensa contra la infección (Rai et al., 2021; Majoul y Compton, 2022;). Entre ellos, los IRFs inducen la expresión de los interferones de tipo I alfa (IFN- α) y beta (IFN- β). Estas moléculas generan un estado antiviral inhibiendo la transcripción y traducción celular, promueven la apoptosis de células infectadas e incrementan la activación y maduración de las células innatas como los macrófagos y células

dendríticas (Taniguchi et al., 2002). Además de los interferones, las citoquinas inflamatorias y las quimioquinas desencadenan la infiltración y activación de células inmunes para contener la infección (Turner et al., 2014). Sin embargo, muchas infecciones virales generan patologías inflamatorias como el síndrome de tormenta de citoquinas, el cual se caracteriza por una respuesta inflamatoria descontrolada con niveles altos de citoquinas proinflamatorias tales como las interleucinas (IL) IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-17, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (del inglés *tumor necrosis factor alpha*) y el interferón gamma (IFN γ) (Cron et al., 2023). Como resultado, se genera daño a nivel sistémico, hiperinflamación y falla orgánica, lo cual es frecuentemente fatal (Cron et al., 2023). El síndrome de tormenta de citoquinas se observa en infecciones por distintos virus RNA, incluyendo DENV (Srikiatkachorn et al., 2017), YFV (Pelletier et al., 2021), JUNV (Cuevas et al., 2011) y CHIKV (Morel et al., 2024).

Finalmente, cabe destacar que, para prevenir la activación inespecífica, crónica o exacerbada del sistema inmune, existen mecanismos de “vuelta a la homeostasis”, incluyendo la expresión de receptores inhibitorios en células inmunes innatas y adaptativas y la expresión de citoquinas antiinflamatorias como la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) (del inglés *tumoral growth factor beta*) (Zhang et al., 2009; Mulay et al., 2022). Los receptores inhibitorios son moduladores indispensables del sistema inmune durante infecciones virales y otras condiciones patológicas, contribuyendo a disminuir el daño provocado por la hiperactivación inmune (An et al., 2023).

4.3 *Proteína reguladora de señales alfa (SIRPA)*

SIRPA es un receptor inhibitorio del sistema inmune, cuyas funciones principales son la regulación negativa de la fagocitosis y la señalización inmune (Barclay y van der Berg, 2014). SIRPA es una proteína transmembrana con un ectodominio formado por tres estructuras de tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana y una región citoplasmática con dos motivos de inhibición basados en tirosina (ITIM) (del inglés immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), que se expresa predominantemente en células mieloides, epiteliales y endoteliales (Barclay et al., 2006) (Figura 4A). Dentro de sus

diversas funciones inhibitorias, la regulación negativa de la fagocitosis es la mejor caracterizada. Mecánicamente, la unión de SIRPA con la proteína de superficie CD47, u otras moléculas expresadas en células diana, inicia una cascada de señalización negativa que bloquea la fagocitosis dependiente de actina filamentosa; por tanto, esta interacción es considerada una señal del tipo "no me comas" que protege a células viables de ser ingeridas accidentalmente por fagocitos (Barclay y Brown, 2009). La interacción de SIRPA con CD47 u otros ligandos desencadena la fosforilación de ambos ITIMs por miembros de la familia de quinasas Src (SFK) (del inglés *Scr family kinase*), culminando con el reclutamiento y la activación de las fosfatasa citoplasmáticas de tirosina con dominio de homología a SH2 SHP-1 y SHP-2 (del inglés *SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*) que, al unirse a SIRPA, inician la cascada de señales que culmina con la inhibición de la fagocitosis debido a la desfosforilación y desactivación de distintas proteínas pro-fagocíticas (Tsai and Discher, 2008; Barclay et al., 2014) (Figura 4B).

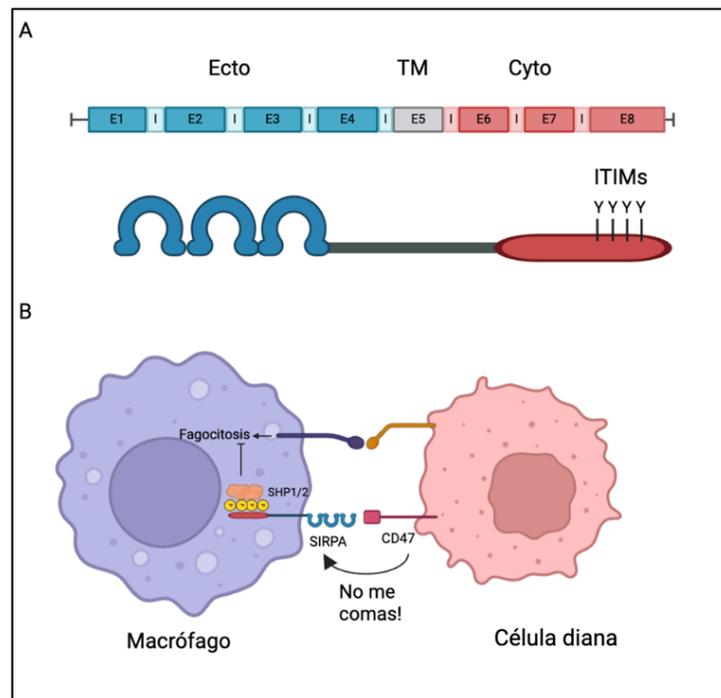


Figura 4. Estructura y función de SIRPA. A. SIRPA es una proteína transmembrana compuesta por un ectodominio (Ecto), un dominio transmembrana (TM) y un dominio citosólico (Cyto) que contiene dos dominios ITIMs con residuos de tirosina (Y). B. Al unirse a su ligando CD47 en células diana, SIRPA fosforilado

une y recluta la fosfatasa SHP-1, la cual inicia una cascada de desfosforilación para desactivar proteínas involucradas en la fagocitosis. Creado en Biorender®

SHP-1 es expresada principalmente por células hematopoyéticas y está involucrada en la modulación, principalmente inhibitoria, de una gran variedad de vías de la respuesta inflamatoria (Kim et al., 2013; Feng et al., 2023). La ausencia de SHP-1 en ratones se asoció a niveles elevados de quimioquinas, como MIP-1 α , CCL4, CXCL1, CXCL10 y MCP-1 ante infecciones por el virus de la encefalomiелitis murina (TMEV) (del inglés *Theiler's murine encephalomyelitis virus*) ((Christophi et al., 2009). Además, se ha demostrado que SHP-1 inhibe la señalización por IFN- γ (Massa et al., 1996) e interferón de tipo 1 (IFN- α e IFN- β) (Min et al., 1998), y la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, IL-12 e IL1- β mediada por análogos de TLR (Ramachandran et al., 2011). Sin embargo, también se ha reportado que SHP-1 regula positivamente la producción de IFN- β en esplenocitos (An et al., 2008) y la señalización mediada por el receptor de IL-6 en macrófagos derivados de la médula ósea de ratones ante estimulación con análogos de TLRs (Rego et al., 2011). Por su parte, SHP-2 puede ejercer funciones tanto inhibitorias como activadoras de la respuesta inmune, y se expresa en la mayoría de los tipos celulares (Chong et al., 2007). La capacidad de SIRPA de unirse a SHP-1 o SHP-2 frente a diferentes estímulos permitiría, por tanto, que actúe como un regulador clave en diversos procesos celulares, incluyendo la señalización inmunológica (Shi et al., 2021).

Se ha propuesto que SIRPA regula negativamente la producción de citoquinas inflamatorias en macrófagos tras su activación por moléculas agonistas de TLRs, tales como lipopolisacárido bacteriano (LPS) y ácido poliinosínico:policitidílico (poly(I:C)), incluyendo la IL-8 (Kim et al., 2013), IL-6, TNF α (Miyake et al., 2008), IL-1 β (Alblas et al., 2005) y la IL-12 (Lin et al., 2023). En este sentido, también se reportó que estímulos inflamatorios tales como IFN- γ , IL-17A, IL-6, TNF α , además de LPS y poly(I:C), promueven la fosforilación de SIRPA y su asociación con SHP-1, pero no SHP-2, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias. Por el contrario, estímulos asociados a respuestas anti-inflamatorias tales como IL-4, IL-10 y TGF- β fosforilan a SIRPA promoviendo su asociación a SHP-2, pero no SHP-1 (Shi et al., 2021).

Si bien la función y señalización de SIRPA ha sido analizada en diferentes condiciones inflamatorias, su rol en la respuesta inmune antiviral no ha sido estudiado en profundidad. Se ha reportado que la infección por el virus de la hepatitis E (HEV) (del inglés *Hepatitis E virus*) aumenta los niveles de expresión SIRPA y que su señalización inhibe la fosforilación del factor de transcripción IRF3, resultando en la supresión de la producción de IFN- β (Huang et al., 2016). También se han asociado aumentos en la expresión de SIRPA durante infecciones por SARS-CoV-2 (McLaughlin et al., 2021). Por su parte, nuestro grupo demostró que la infección viral desencadena la fosforilación de SIRPA, mediante un mecanismo independiente del reconocimiento de CD47, y que su actividad limita la internalización de virus de ARN envueltos pertenecientes a las familias *Flaviviridae*, *Arenaviridae* y *Rhabdoviridae* (Sarute et al., 2021), sugiriendo que SIRPA se activaría durante las primeras etapas de la infección para limitar la entrada viral y, posiblemente, para regular negativamente la respuesta inmune.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo General*

Estudiar el rol de SIRPA en la respuesta antiviral celular contra virus envueltos de genoma RNA.

5.2 *Objetivos Específicos*

- a) Determinar si SIRPA limita la infección por la cepa vacunal 17D y la cepa patogénica Asibi del virus de la fiebre amarilla (YFV-17D y YFV-Asibi), y el virus Mayaro (MAYV).
- b) Analizar el rol de SIRPA en la respuesta autónoma antiviral y las vías de señalización reguladas por su actividad.
- c) Analizar la activación y expresión de SIRPA durante infecciones virales
- d) Generar líneas celulares derivadas de la línea de adenocarcinoma pulmonar A549 y de la línea de leucemia monocítica THP-1 SIRPA *knockout* (KO).

6. MATERIALES Y METODOS

6.1.1 Líneas celulares

En nuestro estudio utilizamos las líneas celulares humanas A549 (adenocarcinoma epitelial de pulmón), Vero (epitelio de riñón de mono verde africano), 293T (epitelio embrionario de riñón), C6/36 (larva de mosquito tigre asiático) y THP-1 (leucemia monocítica humana). Las células A549, Vero y 293T fueron cultivadas en Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) high glucose, GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, *Invitrogen*) y penicilina 100 U/ml y streptomycin 100 µg/ml (P/S, Gibco). Las células C6/36 fueron cultivadas en medio Leibovitz L-15 (L-15) (Gibco) suplementado con 10% de SFB y P/S. Las células THP-1 se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Dutch modificación; Gibco), suplementado con 10% de SFB y P/S. Para la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos, se adicionó al medio ácido dodecamolibdofosfórico (PMA) (50 ng/ml) por 24 horas (h), y posteriormente se cambió el medio de cultivo a RPMI 10% SFB libre de PMA por 72 h antes de su uso. Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37 °C y 5% CO₂.

6.2 Macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón (BMDM)

Las células se obtuvieron de ratones de 8 a 12 semanas de edad de la cepa C57Bl/6 (*wild type*; WT) y *Sirpa*^{tm1Ynliu}J (*Sirpa knockout*; KO) criados en el bioterio del Institut Pasteur de Montevideo (Número de protocolo 009-23). Para su extracción, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se aislaron los fémures de ambos miembros posteriores. El músculo y los tejidos fibrosos de los huesos se retiraron con tijeras y pinzas, y los huesos se lavaron con etanol 70% por 5 minutos (min), seguido de 3 lavados con buffer fosfato salino Dulbecco's (PBS) 1X (Gibco) por 5 min. Posteriormente, se cortaron los extremos de los huesos con el fin de exponer el interior de la médula ósea y se enjuagó el canal óseo inyectando 5 ml de DMEM por uno de los extremos y recolectando el medio con las células por el otro. La suspensión de células y medio se centrifugó a 450 g por 5 min y las células se resuspendieron en medio DMEM 10% SFB, 1% P/S, 0,1% Piruvato de Sodio, 25mM HEPES y 100 µg/ml de la citoquina *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Las células

obtenidas se cultivaron en placa de Petri estéril por 3 días a 37 °C y 5% CO₂, y el medio de cultivo se cambió cada 3 días. A los 7 días post-aislamiento, las células se tripzinizaron, contaron y sembraron para los experimentos indicados en cada figura.

6.3 Virus

La cepa PRVABC59 de ZIKV y la cepa vacunal Candid-1 de JUNV (JUNV-C1) se obtuvieron del *World Reference Center for Emerging viruses and Arboviruses* de la Universidad de Texas Medical Branch. La cepa vacunal 17D y la cepa Asibi del virus de la fiebre amarilla (YFV-17D y YFV-Asibi) fueron cedidos por el laboratorio *Virus Sensing and Signaling* liderado por la Dra. Nolwenn Jouvenet (Insitut Pasteur, Paris). ZIKV se propagó en la línea celular de *Aedes albopictus* C6/36 en medio de cultivo Leibovitz's L-15, mientras que JUNV-C1, YFV-17D y YFV-Asibi fueron propagados en células Vero utilizando medio DMEM. El virus Mayaro (MAYV) fue producido a partir de un clon infeccioso en el Centro de investigación y vigilancia epidemiológica (CIVE) del Instituto Pasteur de Montevideo, liderado por del Dr. Gonzalo Moratorio, y cedido a nuestro laboratorio.

Para la propagación de los virus ZIKV, JUNV-C1 y YFV-17D, las células fueron infectadas a una confluencia del 70-80% con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01-0,05 partículas virales por célula en DMEM 2% SFB. A las 24 horas (h), el medio se removió y se añadió medio de cultivo fresco. El sobrenadante de células infectadas con JUNV-C1 y ZIKV fue colectado a los 4, 5, 6 y 7 días post infección (dpi), mientras que para YFV-17D se colectó a los 5 dpi. El sobrenadante se centrifugó por 5 min a 450 g y 4 °C, se filtró con filtros de 0.45 µm, y fue concentrado y purificado con columnas Vivaspin™ 100 kDa (Cytiva) (6000g, 30X). Los stocks virales se congelaron a -80 °C hasta su uso. La cepa YFP-Asibi fue propagada en células Vero según el protocolo descrito en un laboratorio de bioseguridad Nivel 3 (BSL3) por miembros del laboratorio *Virus Sensing and Signaling* del Institut Pasteur (Paris, Francia).

6.4 *Titulación viral*

Los títulos de ZIKV y YFV-17D fueron determinados por ensayo de placas (PA) en células Vero. Brevemente, las células fueron infectadas a una confluencia del 70-80% con diluciones seriadas del stock viral por 1 h a 37 °C. El inóculo se retiró y se cubrió la monocapa con agarosa 1% en DMEM 2% SFB. A los 5 dpi, se fijaron las células con formalina 10% y se tiñeron con cristal violeta 0.1%. Para la titulación de JUNV-C1 se realizaron ensayos de centros infecciosos (ICA) basados en inmunofluorescencia indirecta en células Vero. Las células fueron infectadas como se describió anteriormente, y a los 3 dpi se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti-nucleoproteína (NP) de JUNV (clon IC06-BA10) (1:100) de BEI Resources, seguido por un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (1:1000). Los centros infecciosos se identificaron y contaron bajo microscopio de epifluorescencia.

6.5 *Silenciamiento de la expresión (knockdown) mediante RNA interferentes pequeños*

Los RNA interferentes pequeños (siRNA) para el silenciamiento de SIRPA, RIG-I, TRIF y un siRNA control (siCTRL) se obtuvieron de Thermo (ID s44445, ID s223615, ID 173696 y ID AM4611, respectivamente), y fueron transfectados usando el reactivo Lipofectamina RNAi Max (Invitrogen) por 48 h, según el protocolo del fabricante. La eficiencia del *knockdown* (KD) se verificó mediante PCR cuantitativa precedida por retrotranscripción (RT-qPCR). Protocolo completo en **Anexo**.

6.6 *Aislamiento de RNA y RT-qPCR*

El RNA total celular se aisló utilizando el *kit Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek)* según el protocolo del fabricante. A partir del RNA aislado, se sintetizó ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa (RT) con la enzima RevertAid (Thermo), siguiendo el protocolo del fabricante, y *random hexamers* (Macrogen). Los niveles de expresión de los genes virales (MAYV, JUNV) y de los transcriptos celulares (SIRPA, RIG-I, TRIF, IFN- β , CXCL10, CCL5, TNF- α e IL-6) se analizaron por qPCR utilizando el reactivo SYBR Green PCR MasterMix (Thermo) y a la expresión del gen *housekeeping*

gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) como referencia. Los primers utilizados para amplificar cada gen se encuentran en la **Tabla S1, Anexo**. Para el cálculo de la expresión relativa se utilizó el gen GAPDH como gen normalizador y como referencia se utilizaron las células siCTRL o las células MOCK para analizar la expresión relativa de genes virales (MAYV, JUNV) y de los transcritos celulares (SIRPA, RIG-I, TRIF, IFN- β , CXCL10, CCL5, TNF- α e IL-6), respectivamente. Protocolo completo en **Anexo**.

6.7 *Infecciones in vitro*

Los stocks virales se diluyeron en DMEM 2% SFB y las células se infectaron a una confluencia de 60-80% utilizando un MOI de 0,5-1 por 1 h a 37 °C. Luego, se retiró el inóculo viral y se incubaron las células por 24-48 h adicionales con DMEM 10% SFB, según lo indicado en cada figura. Las infecciones con YFV Asibi fueron realizadas en un laboratorio BSL-3, como mencionamos, siguiendo el mismo protocolo de infección. Protocolo completo en **Anexo**.

6.8 *Análisis del estado metabólico celular en células SIRPA KD*

Para el análisis de funciones metabólicas celulares se utilizó el equipo Agilent Seahorse XF[®] que cuantifica los cambios en el metabolismo celular en tiempo real en células adheridas. Brevemente, el equipo cuantifica la velocidad de consumo de oxígeno (OCR) y la de acidificación extracelular (ECAR) permitiendo evaluar la respiración mitocondrial y glicólisis, respectivamente (Figura 5). Para analizar estos parámetros en células SIRPA KD y CTRL, utilizamos el protocolo que se describe en **Anexo**.

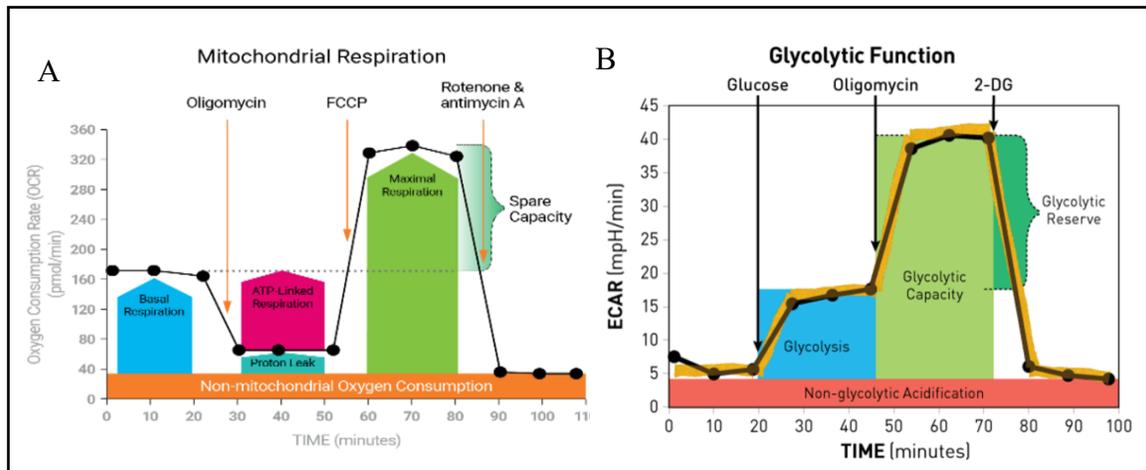


Figura 5. A. Perfil de la prueba de estrés celular mitocondrial Agilent Seahorse XF[®], que muestra los parámetros clave de la función mitocondrial. La medición del consumo de oxígeno (OCR) ante inyecciones secuenciales de oligomicina (oligomycin), Cianuro de carbonilo-4 (trifluorometoxi) (FCCP) y Rotenona y antimicina A (Rotenone, antimycine A) permiten estimar la respiración basal, la producción de ATP dependiente de la respiración y la capacidad respiratoria máxima. B. Perfil de la prueba de estrés de glicólisis Agilent Seahorse XF de los parámetros clave de la función glucolítica. La tasa de acidificación celular (ECAR) ante las inyecciones secuenciales de glucosa (Glucose), oligomicina (oligomycin) y 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) miden la glicólisis, la capacidad glucolítica y permiten el cálculo de la reserva glucolítica y la acidificación no glucolítica. Imagen obtenida del manual de uso del equipo Agilent Seahorse[®].

6.9 Generación de partículas lentivirales SIRPA-GFP y análisis de entrada viral por microscopia confocal

Para generar las partículas lentivirales (Figura 6), se sembraron 500.000 células 293T por pocillo en una placa de 6 pocillos tratada previamente con poly-D-lisina (Poly-D-Lysine) (Thermo) por 30 min. A las 24 horas, se cambió el medio por Opti-MEM (Thermo) 10% SFB, 1% P/S y las células se co-transfectaron con los siguientes plásmidos: empaquetamiento (proteínas gag-pol de HIV-1; 1 mg), transferencia (constructo de fusión SIRPA-proteína fluorescente verde (GFP); 1.5 mg) y envoltura (glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV.G) Addgene #14888; 0.5 mg) utilizando el reactivo Lipofectamine 3000 (Thermo). El sobrenadante conteniendo las partículas virales se recolectó a las 24, 48 y 96 horas post-transfección. El lentivirus se tituló por ensayos ICA en células 293T. Las células

fueron infectadas como se describió para la titulación de JUNV-C1, y a los 6 dpi, los centros infecciosos se identificaron y contaron bajo microscopio de epifluorescencia.

Para la transducción de células A549 con el lentivirus SIRPA-GFP, se prepararon y se sembraron 500 µl de una dilución del lentivirus (MOI=1) con polibreno 1000X (Thermo) en una placa de 6 pocillos. Luego, se añadió una dilución de 50.000 células en DMEM 10% SFB. Las células se incubaron 72 h en estufa a 37 °C con CO2 5% y la eficiencia de transducción se corroboró por microscopía confocal.

Las infecciones con JUNV-C1 (MOI=5) se realizaron por 15 minutos a 37 °C para analizar la internalización del virus. Luego de este período, se fijaron con formalina 10% por 30 min, se permeabilizaron con 0.5% Tritón X-100 en 1X PBS por 15 min y se bloquearon con buffer de bloqueo (22.5 mg/ml BSA en 1X PBS) por 30 min. Finalmente, se incubaron con un anticuerpo contra la nucleoproteína (NP) de JUNV (BEI resources) (1:100) por 1 h a 4 °C, seguido del secundario anti-mouse Alexa Fluor 568 (Invitrogen) (1:1000) 1 h a 4 °C, se montaron los vidrios con medio de montaje con DAPI (Abcam AB104139) y se analizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 800.

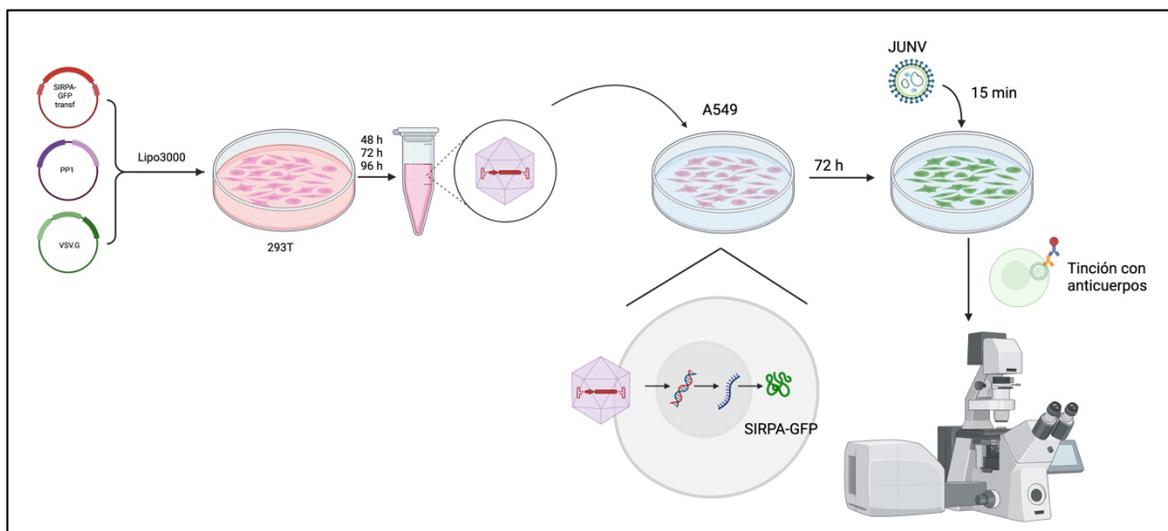


Figura 6. Esquema de estrategia para la generación de partículas lentivirales y análisis de entrada viral. Se transfectaron células 293T con los plásmidos de empaquetamiento (proteínas gag-pol de HIV-1; 1 mg), transferencia (constructo de fusión SIRPA-proteína fluorescente verde (GFP); 1.5 mg) y envoltura (glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV.G) Addgene #14888; 0.5 mg) utilizando el reactivo Lipofectamine 3000 (Thermo). El sobrenadante conteniendo las partículas virales se recolectó a las 24, 48 y

96 horas post-transfección. Células A549 fueron traducidas con el lentivirus SIRPA-GFP, y se incubaron 72 h en estufa a 37 °C con CO₂ 5%. Posteriormente, las células se infectaron con JUNV-C1 (MOI=5) por 15 minutos a 37 °C para analizar la internalización del virus. Las partículas virales se detectaron con un anticuerpo contra la nucleoproteína (NP) de JUNV (BEI resources) y un secundario anti-mouse Alexa Fluor 568 (Invitrogen), y se analizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 800. Creado en Biorender®

6.10 *Estimulaciones con moléculas agonistas de RLRs e IFN-I/IFN-II*

Células A549 o macrófagos diferenciados de monocitos THP-1 se transfectaron con 50 ng de ácido poliinosínico-policitidílico (poly(I:C); Sigma) utilizando el reactivo Lipofectamine 3000 (Thermo), según las indicaciones de transfección de RNA del fabricante. Las células se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ por la duración de la estimulación indicada en cada figura. Para analizar los niveles de expresión de SIRPA en células A549 tratadas con IFN-I (IFN- α 2) e IFN-II (IFN- γ), se incubaron las células con IFN- α 2 (Thermo) (1000 UI) o IFN- γ (20ng/ml) (Thermo) en medio DMEM 10% SFB. Las células se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ por 8 y 48 h posterior a su lisis para análisis del transcrito de SIRPA.

6.11 *Ensayos de inhibición de la familia de quinasas Scr (SFK) y fosfatasa SHP-1*

Se utilizaron 50 μ M de la pequeña molécula PP1 (Sigma) para inhibir a las SFKs y 2 μ M del fármaco TPI-1 (Sigma) para la inhibición de SHP-1. Brevemente, células A549 o macrófagos derivados de THP-1 se pre-incubaron con los inhibidores en DMEM 2% SFB por 45 min a 37°C y posteriormente se lavaron con 1X PBS. A continuación, las células fueron transfectadas con Poly(I:C) como fue descrito o infectadas con MAYV (MOI=1) por 1 h a 37°C en presencia del inhibidor, y finalmente las células se incubaron con DMEM 10% sin inhibidores por los períodos indicados. En estos experimentos usamos DMSO como vehículo para ambos inhibidores.

6.12 *Citometría de flujo (FACS)*

Para evaluar el porcentaje de células infectadas por YFV-17D, YFV-Asibi y ZIKV mediante citometría de flujo, células A549 fueron infectadas por 24 h y posteriormente tripsinadas, fijadas y permeabilizadas en hielo por 30 min con el reactivo Citoperm del Kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences). Luego de esta incubación, las células se lavaron

con el reactivo Citowash, se incubaron con un anticuerpo anti-proteína de envoltura (E) de flavivirus (Abcam; ab286196) (1:1000) por 1 h a 4 °C, y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 647 (Invitrogen) (1:1000) por 45 min a 4 °C. El análisis de la expresión de SIRPA (p84) y de los marcadores de membrana F4/80 y CD86 en BMDMs se realizó utilizando los anticuerpos conjugados en una dilución 1:100, p84-FITC (114006), F4/80-AlexaFluor-647 (123121) y CD86-PE (105007) de Biolegend por 1 h a 4°C en buffer de FACS (1X PBS, 1% SFB, 0,1% Azida de sodio) y posteriormente fijados en formalina 1%. En ambos casos, las células se analizaron en un citómetro de flujo Attune (Invitrogen).

6.13 Western Blot

Para el análisis de proteínas celulares por western blot, las células se lavaron con 1X PBS y lisaron con buffer RIPA (Tris 0.5M, detergente desoxicolato de sodio (DOC) 0.5%, dodecilsulfato sódico (SDS) 1%, cloruro de sodio (NaCl) 0.1.5M, Nonidet-p40 1%) suplementado con el inhibidor de proteasa Halt™ Protease Inhibitor (Thermo). Los lisados se sonicaron con un pulso de amplitud 10% por 10 segundos y se centrifugaron a 13.000 g por 15 min a 4°C. Las muestras fueron desnaturalizadas con buffer SDS-PAGE 5X (azul de bromofenol 0,02%, glicerol 30%, SDS 10%, Tris-ácido clorhídrico (HCl) 250mM pH 6,8 y beta-mercaptoetanol 5%) a 95°C por 5 min, sembradas en gel de acrilamida al 8% y separadas en buffer 1X TGB (Tris 0.025M, Glicina 0.192M) con dodecilsulfato sódico (SDS) 1% por 2 h a 120V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de Difluoruro de polivinilideno (PDV) mediante el protocolo de transferencia húmeda utilizando buffer 1X TGB con metanol 20% a 100V y 4 °C por 2 h. La membrana se bloqueó con seroalbúmina bovina (BSA) 5% o leche en polvo descremada 5% en buffer TBS-T (Tris-base 0.02M, NaCl 0,15M, Tween-20 0.5%) por 30 min y luego se incubó con el anticuerpo primario (SIRPA (D6I3M; CST) (1:1000)), beta tubulina (MAB-16308; Invitrogen) (1:1000), o GAPDH (PA1-988; Invitrogen) (1:1000) por 18 h a 4°C con agitación a 10 rpm. Luego, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T por 5 min en agitación, y luego fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-ratón (AP160P; Thermo) (1:2000) o anti-conejo (81460; Thermo) (1:2000) conjugados a la enzima

peroxidasa de rábano (HRP). La membrana fue posteriormente revelada utilizando el reactivo Pierce ECL (Thermo) y el equipo ImageQuant 800™ (General Electric).

6.14 *Inmunoprecipitación*

Para inmunoprecipitar SIRPA de BMDMs, los macrófagos se sembraron a una confluencia de 90% y al día siguiente se trataron con PP1 como descrito anteriormente y se infectaron con JUNV-C1 o se estimularon con lipopolisacárido bacteriano (LPS) 200 µg/ml e interferón gamma (IFN-γ) recombinante 20 ng/ml por 15 min. Las células fueron lisadas con buffer RIPA-IP (HEPES (Gibco) 0,05M, NaCl 0,25M, EDTA (Gibco) 0,1Mm, Tritón-X100 (Sigma) 1%, DOC 5%) suplementado con inhibidor de proteasa y fosfatasa (Halt™ Phosphatase Inhibitor; Thermo). Los lisados se sonicaron por 10 segundos (s) a una amplitud del 10% y se centrifugaron a 15000 g por 15 min a 4°C. La concentración proteica se determinó mediante el ensayo de Bradford utilizando el reactivo Pierce™ Bradford Protein Assay Kit (Thermo). Para la inmunoprecipitación, se incubaron 1 mg de lisado proteico con el anticuerpo anti-SIRPA (p84) (144036, Biolegend) (1:100) por 4 h a 4°C en rotación. Los inmunocomplejos se incubaron posteriormente con Pierce™ Protein A/G Agarose Beads (Thermo) por 18 h a 4 °C en rotación. Finalmente, los inmunocomplejos se desnaturalizaron con buffer SDS-PAGE 2X a 95 °C por 5 minutos y fueron analizados por western blot utilizando el anticuerpo anti-Phospho-Tyrosine (P-Tyr-1000) (8954; CST) (1:1000).

6.15 *Generación de líneas celulares SIRPA knockout*

Para generar líneas celulares SIRPA *knockout* (KO) utilizamos un sistema basado en la tecnología CRISPR-Cas9 y transducción lentiviral. Los RNA guías (gRNA) para la delección de SIRPA fueron diseñados con el programa CRISPOR (Concordet et al., 2018) a partir de la secuencia del transcripto completo de SIRPA (NM_001040022.1) obtenida de la base de datos de *National Center for Biotechnology Information*. Debido al polimorfismo poblacional de la secuencia de SIRPA, principalmente en los exones 1 al 5, se realizó un KO funcional, utilizando como región *target* al dominio citoplasmático (Cyto) involucrado en la señalización intracelular.

La delección de Cyto se realizó con distintas combinaciones de dos gRNA localizados en el exón 5 (posición nucleotídica 67 y 83) y dos en el exón 8 (posición nucleotídica 112 y 233). Para el diseño de las secuencias del casete de ligación del gRNA al vector de transferencia, se generaron secuencias nucleotídicas que comprenden las secuencias sentido y antisentido de las regiones seleccionadas de SIRPA, secuencias de *annealing* complementarias y secuencias de ligación. Los gRNA fueron sintetizados en *Integrated DNA Technologies* (IDT) y los casetes de gRNA fueron amplificados por PCR. Posteriormente, se digirieron los vectores de transferencia codificantes para la proteína Cas9 y el gen de resistencia a puromicina (Cas9-Puro; Addgene #52961) o blastomicina (Cas9-Blast; Addgene #83480) utilizando la endonucelasa EcoRI (Thermo) y se ligaron a los productos de PCR de los gRNA con la enzima T4 ligasa (Thermo). Los gRNA de reconocimiento al exón 5 (67, 83) fueron ligados al plásmido Cas9-Puro, y los de reconocimiento al exón 8 (112, 233) al Cas9-Blast. Para generar los cuatro vectores lentivirales, se co-transfectaron células 293T con los plásmidos de empaquetamiento psPAX2 (Addgene #12259), envoltura pCMV-VSV-G (Addgene #8454) y los plásmidos de transferencia ligados a los gRNA mediante lipotransfección con el reactivo Mirus Bio™ TransIT™-293 (Mirus). Además, se generó un vector lentiviral control, el cual codifica para un gRNA que no reconocen regiones en el ADN genómico (gRNA scaffold). El sobrenadante conteniendo las partículas lentivirales fue recolectado a las 48 h post-transfección y se utilizó para transducir células A549 y THP-1 con las distintas combinaciones de gRNA para los exones 5 y 8 de SIRPA y el scaffold por 48 h adicionales. Posteriormente, se agregaron los antibióticos puromicina y blastomicina al medio de cultivo y se propagaron las células durante 2 semanas (selección) para finalmente analizar la expresión de SIRPA de la población transducida mediante western blot. Para contar con líneas monoclonales A549 SIRPA KO, se realizó el aislamiento de clones celulares mediante la técnica de dilución de célula única; para ello, se sembraron 100 μ l de suspensión celular conteniendo ~0,3 células por pocillo en placa de 96 pocillos, se incubaron las placas a 37 °C y 5% CO₂ por dos semanas, y finalmente se analizaron por microscopía óptica para seleccionar los pocillos con una sola isla clonal proveniente de una única célula original. Para cada clon aislado, se secuenció la secuencia codificante de SIRPA mediante un

protocolo de secuenciación de nueva generación (NGS), y se confirmó la delección a nivel proteico mediante western blot, utilizando el anticuerpo anti-SIRPA (D6I3M; CST) (1:1000) el cual reconoce el dominio citoplasmático de SIRPA.

6.16 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad 8.1/Prism. Las pruebas estadísticas utilizadas en cada experimento se indican en las leyendas de las figuras. Las barras de error se generaron a partir de la desviación estándar (SD) calculada para el conjunto de valores.

7. RESULTADOS

7.1 SIRPA es un factor de restricción viral activo contra varias familias de virus endocíticos de genoma RNA

Previamente describimos que SIRPA limita la infección de virus pertenecientes a las familias *Arenaviridae*, *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Rhabdoviridae* y *Filoviridae* (Sarute et al., 2021). Con el fin de evaluar si la actividad antiviral de SIRPA se extendía a otros miembros de estas familias y a otras familias de virus emergentes, analizamos su actividad en la infección por las cepas Asibi (patogénica) y 17D (vacunal) del virus de la Fiebre Amarilla (YFV), perteneciente a la familia *Flaviviridae*, y del virus Mayaro (MAYV) de la familia *Togaviridae*. Para ello, transfectamos células A549 con un RNA de interferencia (siRNA) complementario al transcrito de SIRPA (siSIRPA) o con un siRNA control que no reconoce ningún transcrito celular (siCTRL) por 48 h, y las células se infectaron con los virus correspondientes por 24 h. La disminución en la expresión de SIRPA por el *knockdown* (KD) se corroboró por RT-qPCR (Figura 7A) y por western blot (Figura 7B). ZIKV y JUNV-C1 fueron utilizados como control positivo ya que previamente demostramos que la actividad de SIRPA restringe su infección (Sarute et al., 2021). Tras el silenciamiento de SIRPA, los niveles de infección por YFV-Asibi, YFV-17D y MAYV aumentaron significativamente, sugiriendo que SIRPA también limita la infección por estos virus (Figura 8A, B).

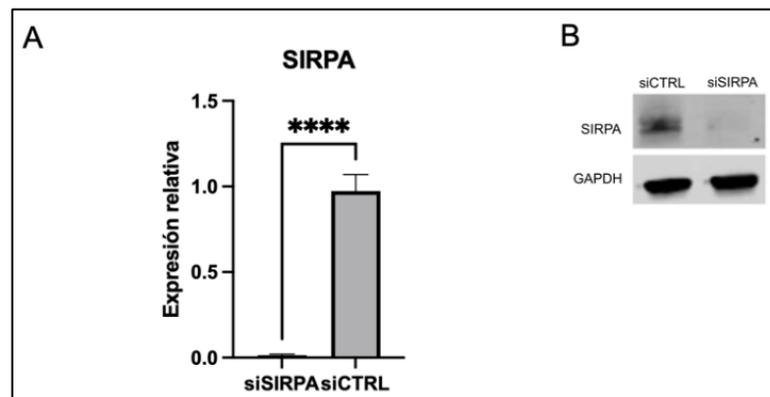


Figura 7. Validación del silenciamiento de SIRPA endógeno en células A549 por RNA interferente. A) Células A549 se transfectaron con un siSIRPA o un siCTRL por 48 h y los niveles de transcripción de SIRPA se evaluaron por RT-qPCR. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó la prueba estadística t-Test (one tail) para determinar la significancia ****; $p \leq 0,01$. B) Se analizaron los niveles de expresión proteica de SIRPA por western blot a las 48 h post-silenciamiento, utilizando un anticuerpo que reconoce el dominio citoplasmático de SIRPA. La detección de GAPDH se utilizó como control interno.

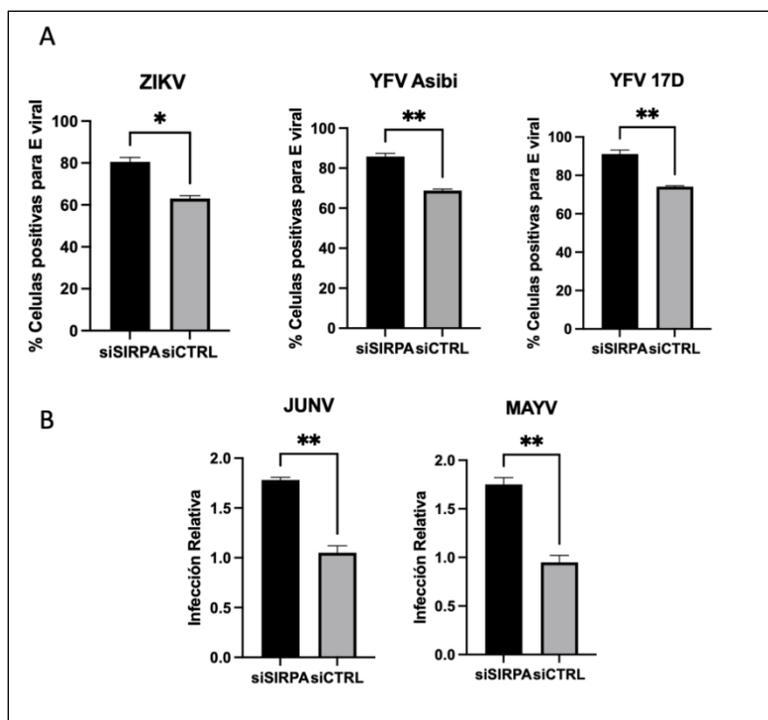


Figura 8. SIRPA es un factor de restricción viral de amplio espectro contra virus pertenecientes a las familias *Flaviviridae*, *Arenaviridae* y *Todaviridae*. A. Células A549 SIRPA *knockdown* (KD) y células control (CTRL) fueron infectadas con ZIKV y YFV-17D a un MOI=0,5 y con YFV-Asibi a un MOI=1 por 48 h; el porcentaje de células infectadas fue cuantificado por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-E. B. Células A549 SIRPA KD y CTRL fueron infectadas con MAYV a un MOI=0,5 y con JUNV-C1 a un MOI=1 y los niveles de infección viral relativa a las células siCTRL fueron determinados mediante RT-qPCR 48 post-infección. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) para determinar la significancia *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,02$.

7.2 Análisis de parámetros metabólicos en células SIRPA *knockdown*

Se ha demostrado que diversas familias virales reprograman el metabolismo celular con el fin de explotarlo para su replicación, y que en respuesta frente a estas infecciones las células activan una “respuesta innata metabólica” para satisfacer las nuevas demandas bioenergéticas y biosintéticas requeridas para combatir la infección (Girdhar K., et al. 2021). Por lo tanto, la capacidad metabólica de una célula durante una infección viral podría afectar la capacidad infectiva viral. Para evaluar si las diferencias que observamos en los niveles de infección se deben a cambios en el metabolismo celular por el *knockdown* de SIRPA, analizamos el metabolismo aeróbico por la función mitocondrial y el metabolismo anaeróbico celular por el flujo glucolítico en células A549 SIRPA KD y CTRL. La tasa de

acidificación extracelular (ECAR) fue cuantificada para evaluar el flujo glucolítico, y la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se utilizó como indicador de la función mitocondrial. Los perfiles de ECAR no fueron significativamente diferentes entre las células SIRPA KD y CTRL, indicando que el metabolismo de la glicólisis es similar en ambas condiciones (Figura 9A). Por otro lado, los perfiles de OCR fueron significativamente superiores en las células SIRPA KD luego de la inyección de FCCP, lo cual sugiere que la disminución en la expresión de SIRPA resulta en un aumento en capacidad respiratoria máxima, o una capacidad respiratoria mayor ante situaciones de estrés metabólico (Figura 9B). A pesar de esto, el metabolismo respiratorio basal no fue significativamente diferente, indicando que en ausencia de estrés el metabolismo mitocondrial no varía ante el KD.

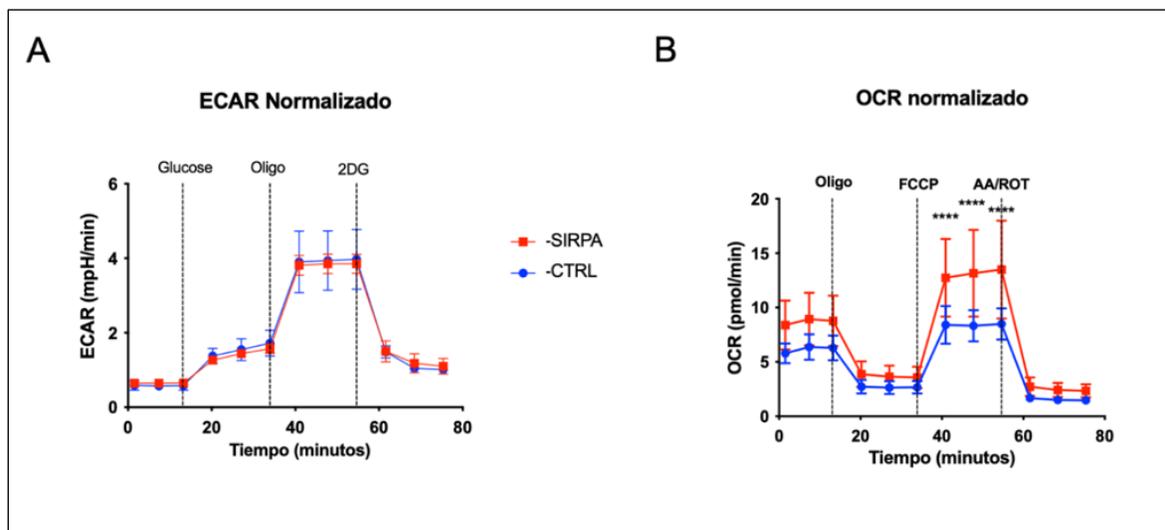


Figura 9. Perfil de la prueba de estrés celular mitocondrial y prueba de estrés de glicólisis en células A549 SIRPA KD vs CTRL por Agilent Seahorse XF®. A. Tasa de acidificación celular (ECAR) ante las inyecciones secuenciales de glucosa, oligomicina (Oligo) y 2-desoxi-D-glucosa (2DG) como indicadores del metabolismo dependiente de la glicólisis. B. Consumo de oxígeno (OCR) celular ante inyecciones secuenciales de Oligo, Cianuro de carbonilo-4 (trifluorometoxi) (FCCP) y Rotenona y antimicina A (AA/ROT) como parámetros clave de la función glucolítica. Se utilizó el test estadístico 2way ANOVA (pos hoc Holm Sídák) para determinar la significancia ****; $p \leq 0,01$.

7.3 Establecimiento de líneas celulares con expresión estable de SIRPA fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) para analizar la entrada viral por microscopía confocal

La entrada de virus envueltos es un proceso dinámico que involucra distintas etapas: adsorción del virus a receptores celulares o moléculas de unión, internalización viral, tráfico endosomal, fusión de membranas virales y celulares, y posterior liberación del material genético para su replicación/transcripción (Ryu, 2017). Con el objetivo de analizar la

actividad de SIRPA durante la internalización viral por microscopía confocal, generamos partículas lentivirales expresando SIRPA fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP) (del inglés *green fluorescent protein*) como transgén en células 293T. Estas partículas SIRPA-GFP fueron utilizadas para transducir células A549 y posteriormente se infectaron con JUNV-C1 (MOI=10) por 15 min a 37 °C para analizar la internalización del virus. Luego de este período, las células se incubaron con un anticuerpo contra la nucleoproteína (NP) de JUNV (BEI resources) y un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 568 (Invitrogen), y se analizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Figura 10A). El constructo de SIRPA-GFP se expresó predominantemente en la membrana celular, aunque también se distribuyó a lo largo del citoplasma. A su vez, visualizamos un mayor número de viriones internalizados en aquellas células que no expresaron SIRPA-GFP (Figura 10B). Este desarrollo biotecnológico nos permitirá analizar posteriormente la entrada de pseudovirus fluorescentes en células vivas, con el objetivo de analizar la dinámica y localización de SIRPA durante la entrada viral en tiempo real.

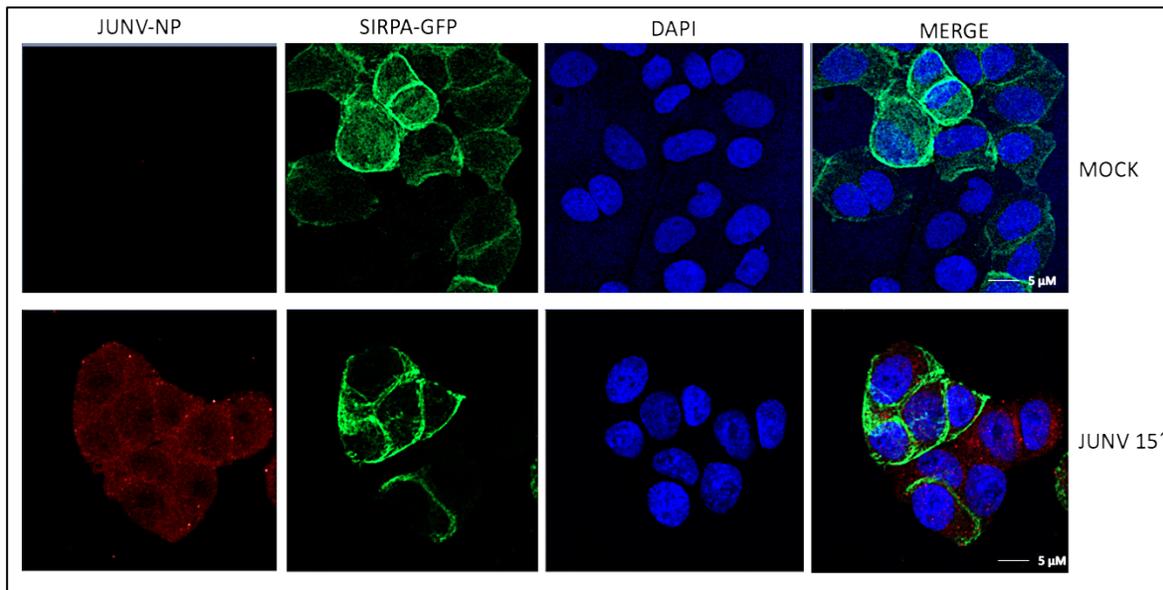


Figura 10. Análisis de la entrada viral en células SIRPA-GFP por microscopía confocal. Microscopía confocal de células A549 transducidas con lentivirus SIRPA-GFP (verde) e infectadas con JUNV-C1 (rojo). Se co-transfectaron células 293T con un plásmido de empaquetamiento expresando las proteínas gag-pol de HIV-1 (PP1), un plásmido codificante de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV.G) y el plásmido codificante para constructo de fusión SIRPA-GFP (SIRPA-GFP transf) utilizando lipofectamina 3000 (Thermo). A los 3 días post-transfección se colectaron y purificaron las partículas lentivirales SIRPA-GFP del sobrenadante. Posteriormente, se transdujeron células A549 con las partículas lentivirales para la integración y expresión estable del constructo SIRPA-GFP.

7.4 *SIRPA regula negativamente la inmunidad autónoma celular frente a infecciones virales por virus RNA*

Inmediatamente después de una infección viral, efectores de la inmunidad intrínseca (movilización y activación de moléculas con función antiviral) y de la inmunidad autónoma celular (producción de IFN-I y genes estimulados por IFN (ISG) (del inglés *interferon stimulated genes*)) proporcionan la primera línea de defensa contra la infección (K. R. Rai, 2021; Majoul y Compton, 2022). Debido a que SIRPA tiene una función antiviral, y a que se ha propuesto que su actividad también regula negativamente la activación inmune, evaluamos si la señalización de SIRPA podría modular la respuesta autónoma antiviral. Para esto, células A549 SIRPA KD y CTRL fueron infectadas con MAYV, JUNV-C1 o ZIKV o transfectadas con ácido poliinosínico:policitidílico (poly(I:C)) para estimular a los sensores citosólicos RLRs como control por 8 o 48 h, y los niveles de expresión de interferón β (IFN- β) y de las quimioquinas antivirales CXCL10 y CCL5 se analizaron por RT-qPCR. A las 8 h post-infección, no se observó expresión de IFN- β para ninguno de los virus analizados, mientras que los niveles de expresión fueron significativamente mayores en las células SIRPA KD transfectadas con poly(I:C) respecto a células CTRL (Figura 11A). Respecto a la expresión de las quimioquinas, observamos niveles de expresión de CXCL10 más elevados en células SIRPA KD infectadas con MAYV o transfectadas con poly(I:C) (Figura 11B), mientras que la expresión de CCL5 fue significativamente superior para todos los virus analizados (Figura 11C). El análisis a las 48 h reveló niveles de expresión más elevados de las tres citoquinas en células SIRPA KD, ya sea infectadas o transfectadas (Figura 12). Colectivamente, estos resultados sugieren que SIRPA modula negativamente la respuesta autónoma celular frente a infecciones virales.

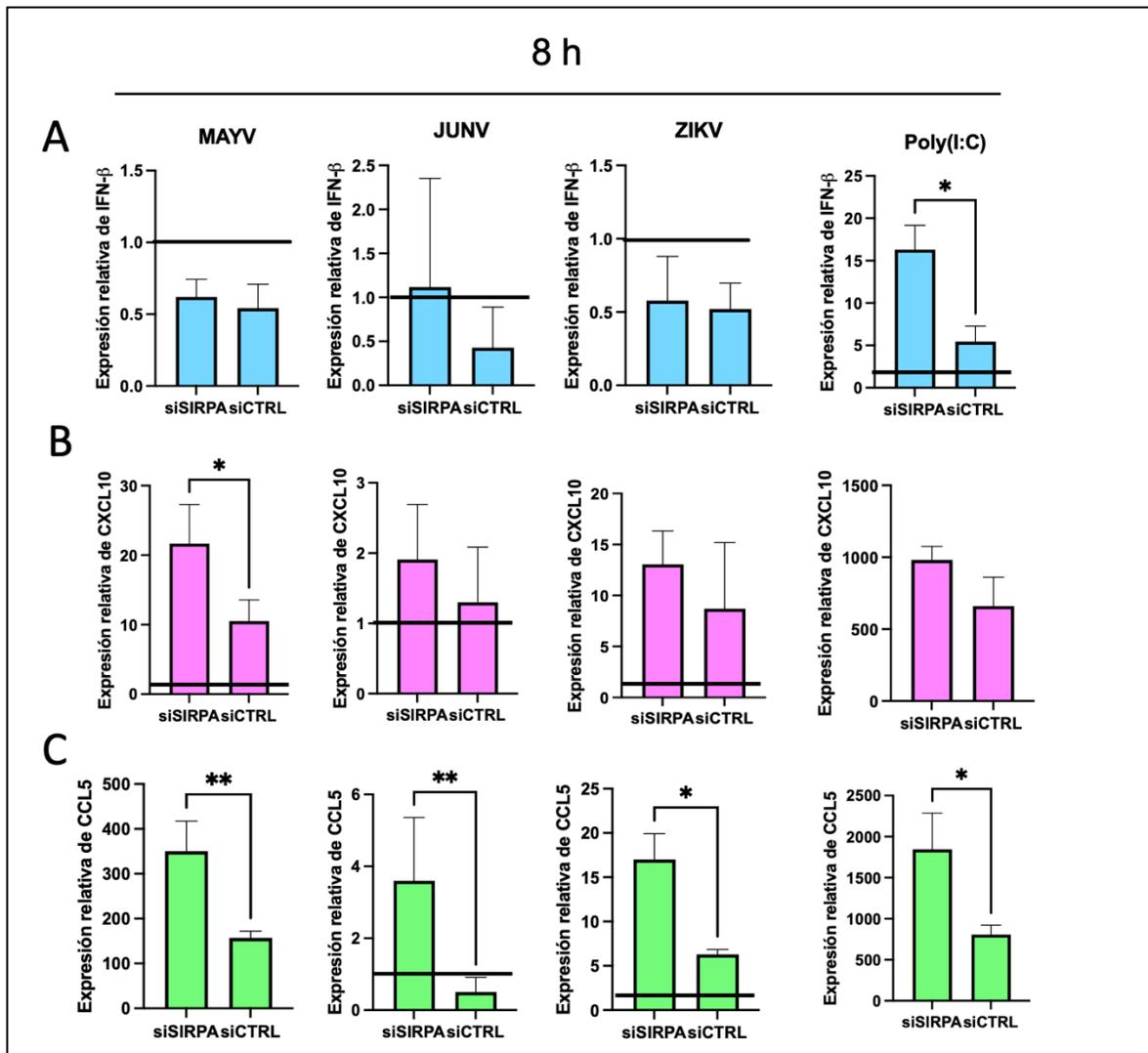


Figura 11. SIRPA modula negativamente la respuesta autónoma celular. Células A549 SIRPA KD y CTRL se transfectaron con poly(I:C) o se infectaron con JUNV-C1, ZIKV y MAYV, y 8 hpi se midieron los niveles de IFN- β (A), CXCL10 (B) y CCL5 (C) relativos a las células MOCK (línea negra), por RT-qPCR. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) para determinar la significancia *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,02$.

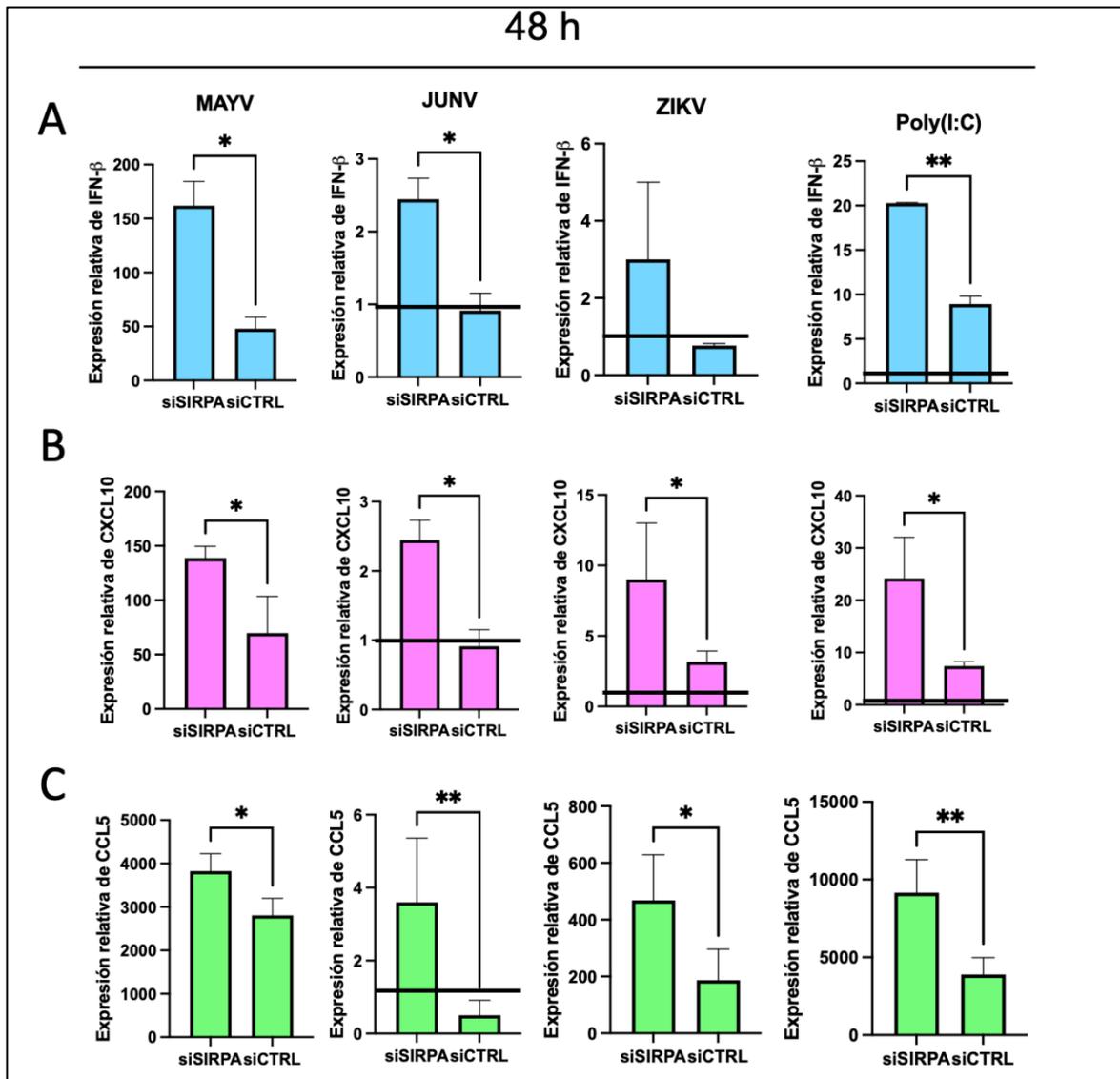


Figura 12. SIRPA modula negativamente la respuesta autónoma celular. Células A549 SIRPA KD y CTRL se transfectaron con poly(I:C) o se infectaron con JUNV-C1, ZIKV y MAYV y 48 hpi se midieron los niveles de IFN- β (A), CXCL10 (B) y CCL5 (C), relativos a las células MOCK (línea negra) por RT-qPCR. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) para determinar la significancia *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,02$.

7.5 *La señalización negativa de SIRPA en la respuesta de IFN- β no involucra al receptor citosólico RIG-I*

El reconocimiento de moléculas de origen viral por receptores del sistema inmune innato inicia cascadas de señalización que inducen la expresión de genes antivirales e IFN-I (Taniguchi et al., 2002). Con el fin de determinar cuáles vías de señalización inmunes son reguladas por SIRPA durante infecciones virales, en primer lugar, analizamos cuales receptores están involucrados en la producción de IFN-I durante la infección por MAYV, debido a que este virus indujo los niveles más elevados de expresión de IFN- β (Figura 12). Para ello, silenciamos la expresión de la proteína adaptadora TRIF, involucrada en la señalización de los receptores endosomales TLR3/4, y del receptor citosólico RIG-I (Figura 13A), y cuantificamos la expresión de IFN- β en células A549 infectadas con MAYV 48 hpi. No observamos diferencias en los niveles de IFN- β en células TRIF KD respecto a células CTRL; sin embargo, la expresión de IFN- β se redujo significativamente en células RIG-I KD, indicando que la principal vía de inducción de IFN- β durante la infección con MAYV depende de la activación de este receptor (Figura 13B). En base a estos resultados, analizamos la inducción de IFN- β por la infección con MAYV en células A549 co-transfectadas con un siSIRPA y un siRIG-I. La expresión de IFN- β en las células SIRPA KD fue significativamente mayor respecto a células CTRL independientemente de los niveles de expresión de RIG-I (Figura 13C), sugiriendo que la señalización inhibitoria de SIRPA en la vía del IFN- β no es dependiente de RIG-I.

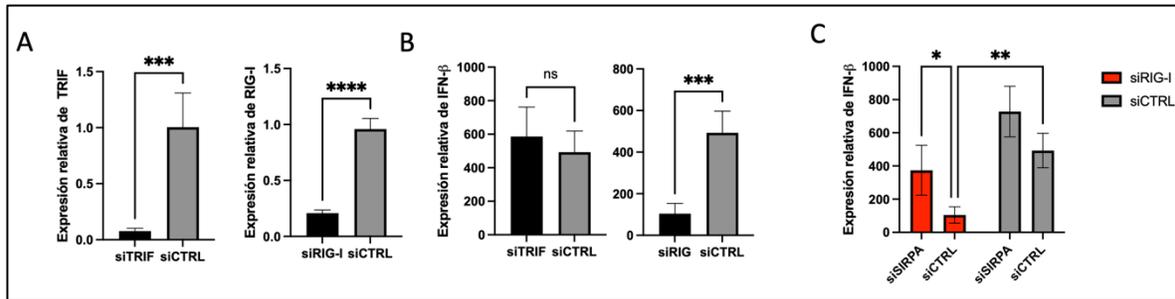


Figura 13. SIRPA no regula la producción de IFN-β mediada por RIG-I. A) Células A549 fueron transfectadas con un siTRIF, siRIG-I, o siCTRL por 48 h y los niveles de expresión se evaluaron por RT-qPCR. B) Células A549 RIG-I KD y TRIF KD se infectaron con MAYV por 48 h y la expresión de IFN-β se analizó por RT-q-PCR. C) Células A549 transfectadas con un siRIG-I y un siSIRPA, de manera individual o combinada, se infectaron con MAYV por 48 h y la expresión de IFN-β se analizó por RT-qPCR. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) (A, B) o 2-way ANOVA (C) para determinar la significancia *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,021$, ***; $p \leq 0,02$; ****; $p \leq 0,01$, ns; no significativo.

7.6 La señalización mediada por SIRPA no regula la producción de citoquinas

inflamatorias ni el fenotipo de macrófagos bajo condiciones inflamatorias e infección viral

Como parte fundamental del sistema inmune, los macrófagos pueden iniciar respuestas innatas y adaptativas durante infecciones virales para controlar la infección por distintos mecanismos (Banete et al., 2021). Sin embargo, infecciones por virus hemorrágicos de las familias *Arenaviridae* y *Flaviviridae* pueden provocar el fenómeno de tormenta de citoquinas, debido a la producción exacerbada de mediadores proinflamatorios por monocitos y macrófagos (Flórez-Álvarez et al., 2022). Recientemente, se propuso que SIRPA regula la activación/polarización de macrófagos y la producción de citoquinas inflamatorias por este tipo celular (Lin et al., 2023); por tanto, evaluamos si SIRPA también podría regular la inducción temprana de las citoquinas proinflamatorias TNF-α e IL-6 en infecciones virales. Para ello, macrófagos derivados de monocitos humanos THP-1 fueron transfectados con un siSIRPA y 48 h después se infectaron con JUNV-C1 por 2 h, o se transfectaron con poly(I:C) como control, para analizar los niveles de expresión de TNF-α e IL-6. Además, cuantificamos la expresión de IFN-β y CXCL10 en este tipo celular ya que previamente mostramos que SIRPA modula la producción de ambas citoquinas en condiciones de infección viral en células A549 (Figura 12). Bajo estas condiciones, no encontramos diferencias significativas en la inducción de TNF-α o IL-6 entre macrófagos SIRPA KD y CTRL infectados con JUNV-C1

(Figura 14A) o estimulados con poly(I:C) (Figura 14B), aunque los niveles de IFN- β y CXCL10 fueron más elevados en células SIRPA KD. Estos resultados indican que SIRPA no modula la producción de citoquinas inflamatorias en macrófagos en condiciones de infección viral.

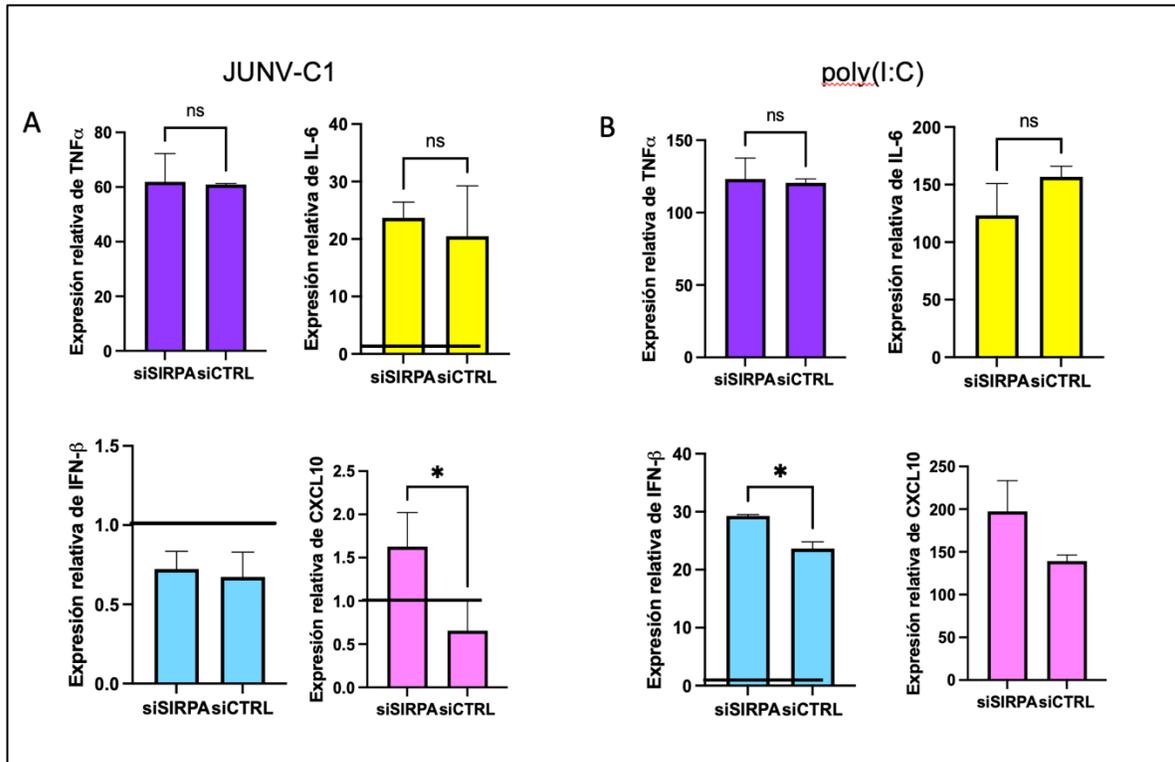


Figura 14. La actividad de SIRPA no regula la producción de TNF α y IL-6 en macrófagos derivados de THP-1. Monocitos THP-1 se diferenciaron a macrófagos con PMA (50 ng/ml) por 24 h y se transfectaron con un siSIRPA o un siCTRL. A las 48 h post-silenciamiento, las células se infectaron con JUNV-C1 (A) o se transfectaron con poly(I:C) (B) por 2 h, y se cuantificaron los niveles de TNF- α , IL-6, IFN- β y CXCL10 relativos al MOCK (línea negra) por RT-qPCR. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) para determinar la significancia. *; $p \leq 0,05$, ns; no significativo.

Para analizar si la expresión de SIRPA podría regular la polarización de macrófagos al fenotipo M1 inflamatorio durante infecciones virales, aislamos macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) de ratones *Sirpa knockout* (*Sirpa* KO) y ratones C57BL/6 (*wild type*; WT), y analizamos la expresión de SIRPA, F4/80 (marcador de macrófagos), y CD86 (marcador de macrófagos M1) por citometría de flujo y western blot. En primer lugar, se confirmó la ausencia de la expresión de *Sirpa* en las células *Sirpa* KO por ambos métodos (Figura 15A), y asimismo determinamos que no hubo diferencias en el porcentaje de células diferenciadas a macrófagos (F4/80+) entre las poblaciones de ambos genotipos (Figura

15B). Posteriormente, infectamos macrófagos diferenciados con JUNV-C1 a un MOI=1 o los estimulamos con LPS (250 ng/ml) /IFN- γ (20 ng/ml) por 48 h para analizar la expresión de CD86 como marcador de polarización hacia el fenotipo M1. El porcentaje de células CD86+ fue significativamente mayor en los macrófagos estimulados con LPS/IFN- γ pero no en las poblaciones infectadas con JUNV-C1, en relación a células control no infectadas (MOCK), indicando que la infección viral no polarizó a los macrófagos hacia un fenotipo inflamatorio (Figura 15C). Además, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de macrófagos CD86+ Sirpa KO y WT para ninguna de las tres condiciones analizadas (Figura 15D).

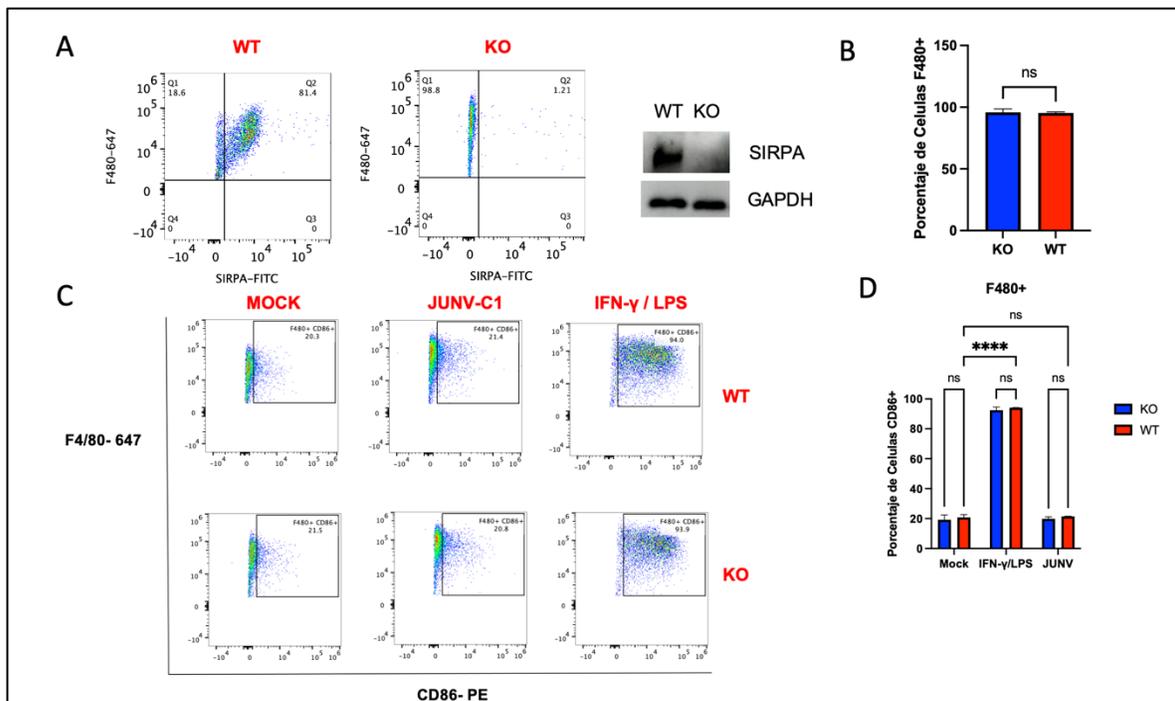


Figura 15. La expresión de SIRPA no regula la polarización de macrófagos a M1 por LPS/IFN γ .

A) Análisis de la expresión de Sirpa por citometría de flujo y western blot en BMDMs Sirpa KO y WT. B) Cuantificación de la expresión del marcador F4/80 en BMDMs de ambos genotipos. C) BMDMs Sirpa KO y WT fueron infectados con JUNV-C1 (MOI=1) o estimulados con LPS/IFN- γ por 48 h, y se analizó la expresión de Sirpa, F4/80 y CD86 utilizando anticuerpos conjugados. D) Cuantificación del porcentaje de células CD86+ bajo las distintas condiciones analizadas. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) para determinar la significancia *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,021$, ***; $p \leq 0,02$, ns; no significativo.

7.7 Las quinasas de la familia Src (SFks) fosforilan a SIRPA durante la invasión viral, independientemente de su interacción con CD47, y regulan su actividad antiviral e inmunomodulatoria

Shi y cols (2021) demostraron que la señalización negativa de SIRPA requiere la fosforilación de ambos ITIMs por miembros de la familia de quinasas de tirosina Src (SFk). En condiciones basales, existe una fosforilación mínima de SIRPA; sin embargo, estímulos inflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-17A, LPS y poly(I:C) inducen la rápida fosforilación de SIRPA por SFks y, por lo tanto, su asociación con las fosfatasas SHP-1/-2 (Shi et al., 2021). Dado que nuestro grupo demostró que SIRPA limita la internalización viral, un paso temprano del ciclo replicativo, especulamos que el estímulo para su fosforilación y actividad inhibitoria debe detectarse durante la invasión viral. Para analizar esta hipótesis, se preincubaron BMDMs de ratones WT (BEI resources, #NR-9456) con el inhibidor de quinasas Src PP1 o con un vehículo (DMSO) por 30 min, y se infectaron con JUNV-C1 o se estimularon con LPS/IFN- γ como control por 15 min. Posteriormente, se lisaron las células, se utilizó un anticuerpo anti-SIRPA (clon p84) para su inmunoprecipitación a partir de 250 ng de lisado proteico y los niveles de fosforilación de SIRPA se determinaron por western blot utilizando un anticuerpo que detecta tirosina fosforilada. En células MOCK, detectamos una moderada fosforilación de SIRPA, mientras que la infección con JUNV-C1 y la estimulación con LPS/IFN- γ aumentaron considerablemente los niveles de fosforilación (Figura 16A). En aquellas muestras dónde utilizamos el inhibidor PP1, la fosforilación de SIRPA fue indetectable independientemente del estímulo, confirmando que esta familia de quinasas de tirosina también fosforila a SIRPA durante la entrada viral (Figura 16A).

Debido a que CD47 es el ligando principal de SIRPA, y a que previamente mostramos que la actividad inhibitoria de SIRPA en la entrada viral no se asocia al reconocimiento de CD47 en la envoltura viral (Sarute et al., 2021), examinamos si la interacción de CD47 con SIRPA en cis (en la superficie de la misma célula) podría promover su fosforilación frente a infecciones virales. Para ello, incubamos células A549 con un anticuerpo bloqueante anti-CD47 por 1 h, o un isotipo control, y posteriormente las infectamos con JUNV-C1. No encontramos diferencias en los niveles de infección entre células tratadas con el anti-CD47

y células control (Figura 16B), indicando que la interacción SIRPA-CD47 en cis no está involucrada en la fosforilación y activación de SIRPA.

Para determinar si la fosforilación de SIRPA por SFKs también es relevante para su función en la respuesta autónoma antiviral, incubamos células A549 y macrófagos derivados de monocitos THP1 SIRPA KD y CTRL con PP1 por 30 min y posteriormente las infectamos con MAYV por 48 h, o estimulamos con poly(I:C) por 2 h respectivamente, para analizar niveles de expresión de IFN- β . Las células CTRL tratadas con PP1 expresaron niveles de IFN- β significativamente mayores que las células tratadas con el vehículo (DMSO); sin embargo, no detectamos diferencias significativas entre las células SIRPA KD tratadas con el inhibidor o con el vehículo, sugiriendo que la inhibición de las SFKs modula negativamente la expresión de IFN- β principalmente previniendo la fosforilación de SIRPA (Figura 16C). Finalmente, analizamos si la función negativa de SIRPA en la expresión de IFN- β se asocia al reclutamiento y posterior señalización mediada por SHP-1. Para ello, células A549 SIRPA KD y CTRL se pre-incubaron con el inhibidor específico de SHP-1 TPI-1 y luego se infectaron con MAYV por 48 h. No se encontraron diferencias significativas entre las células tratadas con el inhibidor o con el vehículo (Figura 16D), lo que indica que la señalización mediada por SIRPA, responsable de modular la respuesta autónoma en la infección por MAYV, es independiente de SHP-1 en este tipo celular. SHP-1 es expresado principalmente por células hematopoyéticas (Kim et al., 2013); por lo tanto, macrófagos derivados de THP-1 SIRPA KD y CTRL se pre-incubaron con TPI-1 y luego se transfectaron con poly(I:C) por 2 h. A diferencia de A549, se observaron diferencias significativas entre el IFN- β expresado por las células CTRL tratadas con el inhibidor y el vehículo, indicando que SHP-1 cumple un rol modulador negativo en la expresión de esta citoquina (Figura 16D). Sin embargo, la inducción de IFN- β fue significativamente mayor entre células SIRPA KD tratadas con el inhibidor y el vehículo, indicando una acción aditiva entre el silenciamiento de SIRPA y la inhibición de SHP-1. Estos resultados sugieren que si bien SHP-1 regula negativamente la producción de IFN- β , la señalización mediada por SIRPA también es independiente de SHP-1 en este tipo celular.

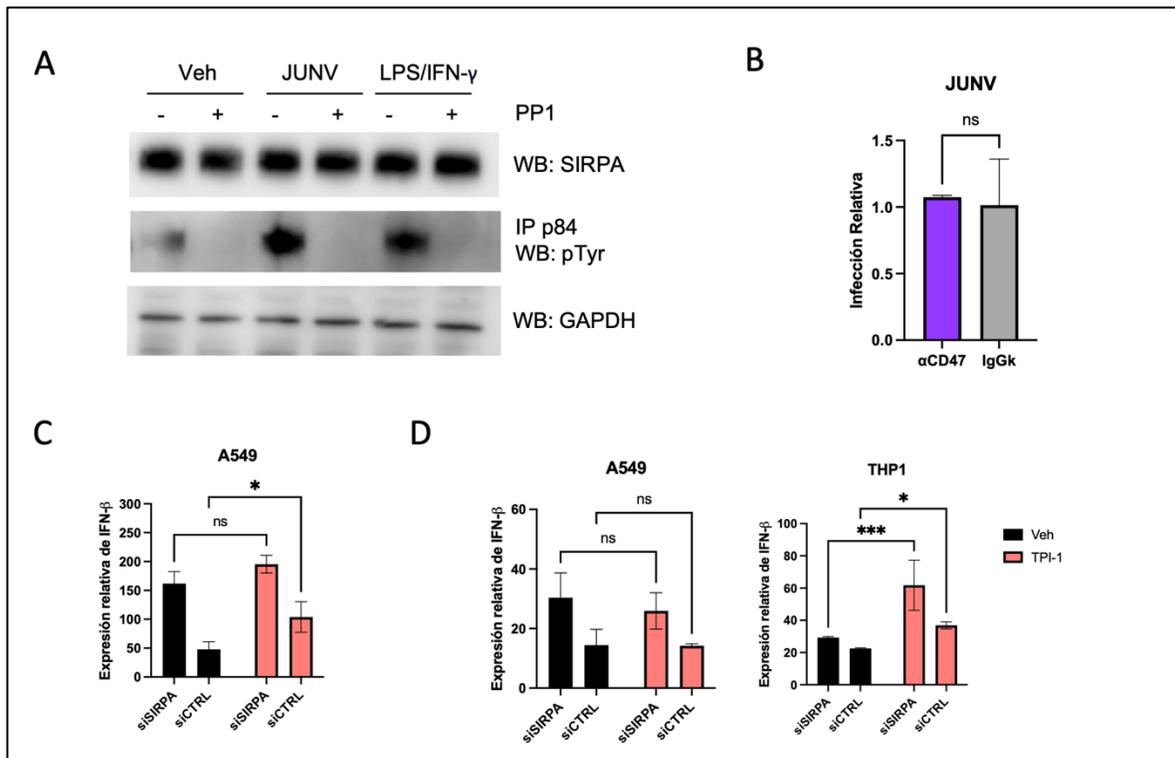


Figura 16. SIRPA se fosforila por las quinasas Src durante infecciones virales y estímulos inflamatorios independientemente de su interacción con CD47, modulando su actividad inhibitoria. A) Macrófagos NR-9456 se trataron con el inhibidor PP1 (50 μ M) o con un vehículo (DMSO) por 30 min y luego se infectaron con JUNV-C1 MOI=5 o se estimularon con LPS/IFN- γ por 15 min en presencia o ausencia del inhibidor. Sirpa fue inmunoprecipitada con el anti-Sirpa p84 (Biologend) y la fosforilación de tirosina se detectó por western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-fosfotirosina (P-Tyr-1000) (Cell Signaling Technologies). B) Células A549 se pre-incubaron con un anticuerpo neutralizante para CD47 (α -CD47) o un isotipo control (IgGk) por 1 h y se infectaron con JUNV-C1 para analizar niveles de infección 48 h post-infección. Células A549 SIRPA KD y CTRL se trataron con el inhibidor PP1 (C) o TPI-1 (D), se infectaron con MAYV por 48 h o se estimularon con poly(I:C) por 2 h respectivamente, y se cuantificaron los niveles de IFN- β por RT-qPCR. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) (B) o 2-way ANOVA (C, D) para determinar la significancia *; $p \leq 0,05$, ns; no significativo.

7.8 La expresión de SIRPA aumenta ante infecciones virales y estímulos inflamatorios, pero no es inducida por interferón del tipo I/II

En este trabajo demostramos que SIRPA fosforilada regula negativamente la inmunidad autónoma celular y que las infecciones virales y estímulos inflamatorios desencadenan su fosforilación y activación. Por lo tanto, hipotetizamos que, si SIRPA es un modular negativo de la activación inmune y que tanto los virus como los estímulos inflamatorios pueden activarla, también podrían existir mecanismos de regulación positiva de su expresión ante dichos estímulos. Para analizar esta posibilidad, infectamos células

A549 con JUNV-C1, YFV-17D, ZIKV y MAYV o las transfectamos con poly(I:C) por 8 o 48 h, para cuantificar la expresión de SIRPA por RT-qPCR y western blot. Efectivamente, los niveles de transcrito de SIRPA aumentaron significativamente a las 8 y/o 48 h en todas las condiciones analizadas, aunque durante las infecciones por YFV-17D y MAYV el incremento en la expresión fue mayor a las 8 h, mientras que en las infecciones por ZIKV y JUNV-C1 y en la estimulación con Poly(I:C) la expresión aumentó a lo largo del tiempo (Figura 17A). En el caso de la infección por ZIKV, dónde el incremento en la expresión de SIRPA fue más marcado entre intervalos, también analizamos niveles de expresión proteica. Como se muestra en la figura 17B, la expresión de SIRPA a las 8 y 48 hpi fue mayor respecto a células MOCK no infectadas.

Una característica principal de la respuesta autónoma antiviral es la expresión de cientos de genes estimulados por IFN-I (ISGs), incluyendo mediadores inflamatorios y quimioquinas, que promueven el establecimiento de un estado antiviral (K. R. Rai, 2021). Teniendo en cuenta que SIRPA es un factor antiviral que modula la respuesta de IFN-I, aquí analizamos si la expresión de SIRPA se induce por el tratamiento por IFN-I, es decir, si SIRPA es un ISG. A su vez, los interferones de tipo II (IFN-II), como el IFN- γ , también son claves en la respuesta antiviral contra estos virus debido a que inducen la expresión de genes con elementos del sitio de activación de IFN- γ (GAS) con función antiviral (Decker et al., 1997; Asper et al., 2004; Shrestha et al., 2006; Wu et al., 2019; Kang et al., 2018). Por esta razón, también analizamos si el tratamiento con IFN- γ podría inducir la expresión de SIRPA y, por lo tanto, si SIRPA cuenta con elementos GAS. Para esto, analizamos los niveles de expresión de SIRPA en células A549 tratadas con IFN-I (IFN- α 2) e IFN-II (IFN- γ) por 8 h. Los tratamientos con IFN- α 2 o IFN- γ no indujeron la transcripción de SIRPA, mientras que los niveles de expresión de la proteína de resistencia al Myxovirus A (MxA), un efector antiviral inducido por IFN-I/II (Haller y Kochs, 2020), aumentó significativamente en ambos casos (Figura 17C).

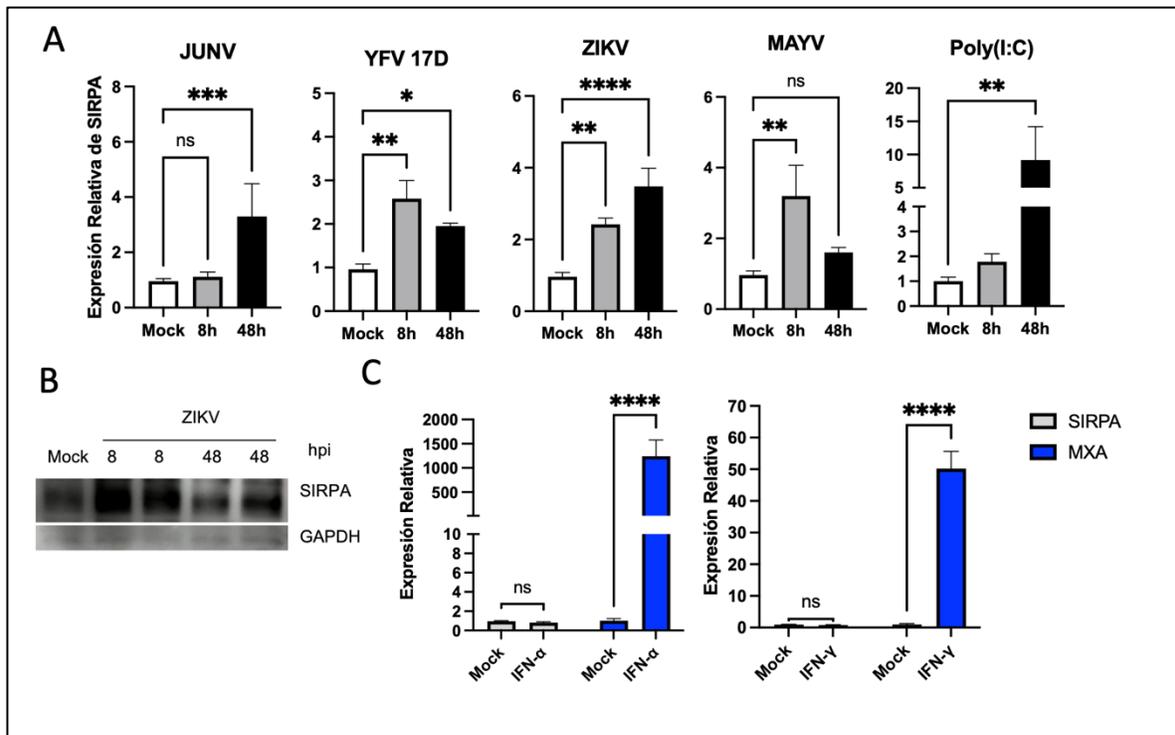


Figura 17. La expresión de SIRPA aumenta frente a infecciones virales, pero no frente al tratamiento con IFN-I/II. A) Células A549 fueron infectadas con JUNV-C1, YFV-17D, ZIKV y MAYV o transfectadas con poly(I:C) por 8 y 48 h y los niveles de transcrito de SIRPA se evaluaron por RT-qPCR. B) Células A549 fueron infectadas con ZIKV MOI 1 y los niveles de SIRPA se analizaron 8 y 48 hpi por western blot. C) Células A549 se trataron con IFN- α o IFN- γ por 8 h y se cuantificó la expresión relativa de SIRPA y MxA por RT-qPCR. Se realizaron tres réplicas biológicas y se utilizó el test estadístico one way ANOVA (A) 2-way ANOVA (D) para determinar la significancia *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,021$, ***; $p \leq 0,02$; ****; $p \leq 0,01$.

7.9 Generación y validación de líneas celulares humanas SIRPA knockout

La generación de células A549 y THP-1 SIRPA *knockout* (KO) se realizó mediante la tecnología CRISPR-Cas9. Brevemente, los RNA guías (gRNA) utilizados fueron diseñados para eliminar al dominio citoplasmático (exones 5-8), con el fin de generar un KO funcional, y se diseñaron dos gRNAs por exón para aumentar las probabilidades de edición. En las poblaciones de A549 y THP-1 SIRPA KO analizadas, no se detectó expresión de SIRPA (Figura 18A, B), ni en los clones individuales derivados de las poblaciones A549 67/112 y 67/233 (Figura 18C) utilizando un anticuerpo que reconoce el dominio citoplasmático. Los clones

M (67/112) y D (67/233) fueron elegidos aleatoriamente para su secuenciación y para posteriormente validar la delección de este dominio. En el clon D se obtuvo más de una secuencia nucleotídica para SIRPA, indicando la presencia de más de un clon celular (resultados no mostrados). En el clon M detectamos la inserción de una timina en el exón 5, provocando un cambio en el marco abierto de lectura corriente abajo y la generación de un codón stop prematuro en el exón 7 (Figura 18D). Estas células SIRPA KO derivadas del clon M fueron infectadas con ZIKV, YFV-17D, YFV-Asibi y MAYV, y los niveles de infección se determinaron por citometría de flujo o RT-qPCR. Como fue descrito para células SIRPA *knockdown*, los niveles infección de células KO fueron significativamente mayores que en células CTRL (Figura 18E, F), validando que el KO funcional de SIRPA abrogó su actividad antiviral.

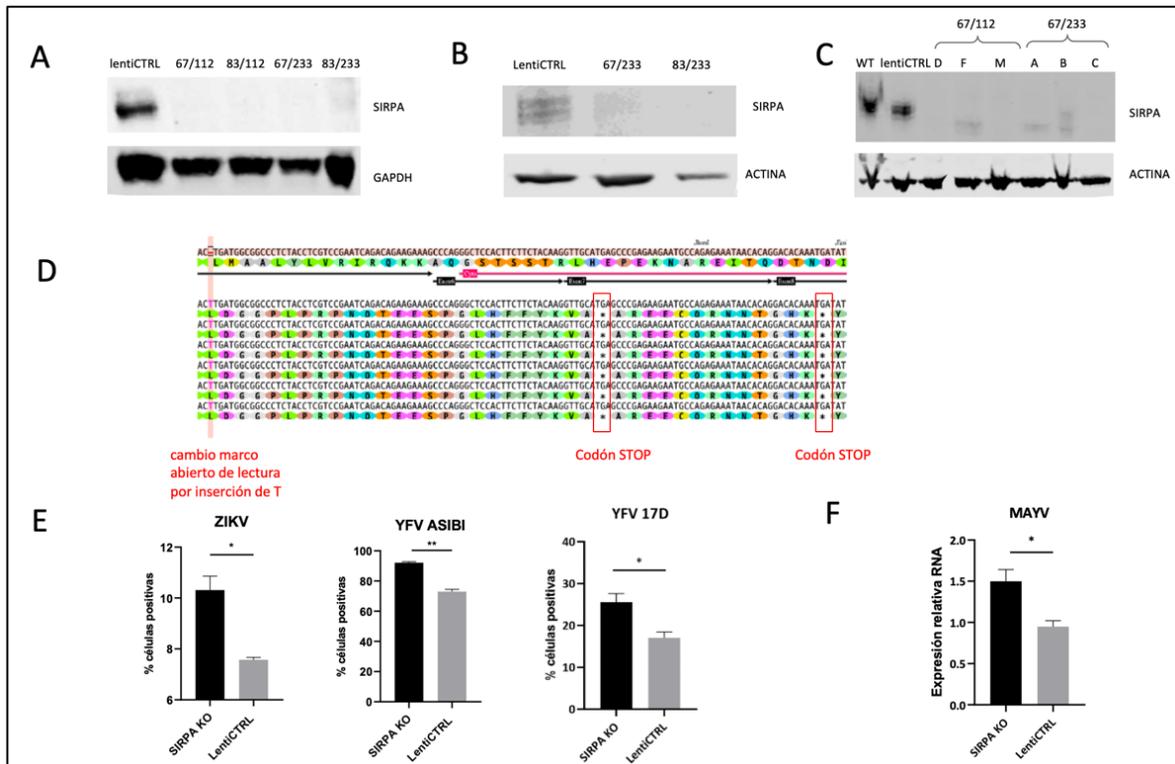


Figura 18. Validación de células SIRPA *knockout* (KO). Análisis de la expresión de SIRPA en poblaciones SIRPA KO de células A549 (A) y THP-1 (B) y en los clones aislados de la población parental de A549 (C) respecto a células WT y células control de la transducción lentiviral (LentiCTRL). El anticuerpo de SIRPA utilizado en el WB reconoce el dominio citoplasmático. D) Análisis de la secuencia nucleotídica de SIRPA correspondiente al clon M. Células A549 SIRPA KO (clon M) y LentiCTRL fueron infectadas con ZIKV, YFV-Asibi y YFV-17D y el porcentaje de células infectadas fue evaluado por citometría de flujo (D), o infectadas con MAYV y los niveles de infección se analizaron mediante RT-qPCR (F). Se utilizó el test estadístico t-Test (one tail) para determinar la significancia *; $p < 0,05$.

8. DISCUSIÓN

A lo largo de la carrera co-evolutiva virus-hospedero, los vertebrados han desarrollado sistemas de defensa antivirales como parte de la respuesta inmune intrínseca y autónoma. La inmunidad intrínseca está mediada por proteínas expresadas constitutivamente por las células, capaces de bloquear directamente distintas etapas del ciclo replicativo viral, incluyendo la entrada viral, replicación/transcripción, brotamiento, entre otras. La respuesta inmune autónoma se caracteriza por la producción de interferones del tipo I (IFN-I), los cuales orquestan el estado antiviral celular de forma indirecta y, en conjunto con las quimioquinas, promueven el reclutamiento de células del sistema inmune innato con el fin de evitar la dispersión y contener la infección a un número limitado de células (Rai et al., 2021; Majoul y Compton, 2022).

SIRPA es una proteína transmembrana de la respuesta inmune intrínseca que limita el ingreso de virus endocíticos pertenecientes a diversas familias a células humanas y murinas (Sarute et al., 2021). En esta tesis, expandimos estas observaciones previas y demostramos que células SIRPA *knockdown* (KD) son más susceptibles a infección por los flavivirus YFV-17D y YFV-Asibi y por el togavirus MAYV, indicando que SIRPA también tiene un rol antiviral frente a estas infecciones (Figura 8). Dichos estudios también fueron realizados en células A549 con un *knockout* (KO) funcional de SIRPA generadas por la tecnología CRISPR-Cas9 durante esta Tesis, confirmando los resultados observados en células SIRPA KD para YFV y MAYV y que el dominio citoplasmático de SIRPA es esencial para su actividad antiviral (Figura 18; Sarute et al., 2021).

Durante las infecciones virales, las células deben satisfacer diversas demandas bioenergéticas y biosintéticas para combatir la infección (El-Bacha et al., 2004; Jordan et al., 2016; Girdhar et al., 2021). Para evaluar si el silenciamiento de SIRPA podría afectar parámetros metabólicos celulares que determinen un aumento en los niveles de replicación viral, analizamos perfiles de ECAR y OCR en células SIRPA KD. El análisis de los perfiles de ECAR mostró que las tasas de consumo de oxígeno basal, la capacidad máxima de consumo de oxígeno y el consumo de oxígeno independiente a la mitocondria, no fueron alterados

por el silenciamiento de SIRPA. En cuanto a los perfiles de OCR, la acidificación no glucolítica, la tasa de glicólisis basal y la capacidad glucolítica de reserva tampoco se vieron alterados. Sin embargo, la capacidad respiratoria máxima celular bajo estrés mitocondrial aumentó en las células SIRPA KD (Figura 9). Si bien no podemos descartar que el aumento en la capacidad respiratoria máxima favorezca la replicación viral en las células SIRPA KD, estudios adicionales, incluyendo el análisis de estos parámetros en células SIRPA *knockout* y en células *knockdown* para otros genes pro- y anti-virales, son necesarios para concluir la relación entre los niveles de expresión de SIRPA y el metabolismo celular durante infecciones virales.

Debido a que SIRPA es un factor antiviral que limita la infección de varias familias de virus emergentes, es de nuestro interés generar nuevas herramientas para caracterizar su actividad antiviral mediante distintas estrategias. En este sentido, generamos una línea celular con expresión estable de SIRPA fusionada a la proteína fluorescente verde (SIRPA-GFP), para caracterizar su localización y dinámica subcelular durante la entrada viral por microscopía de fluorescencia. Aquí, analizamos la entrada de JUNV-C1 mediante microscopía confocal en células A549 SIRPA-GFP utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la NP viral, observando un menor número de partículas virales en aquellas células con expresión estable de SIRPA-GFP (Figura 10). A partir de esta técnica, posteriormente analizaremos la cinética de entrada de pseudovirus fluorescentes a células SIRPA-GFP+ y SIRPA-GFP- y la dinámica de SIRPA en tiempo real durante este proceso. Se ha descrito que distintos estímulos inflamatorios favorecen la agrupación (*clustering*) de SIRPA en balsas lipídicas de la membrana plasmática aumentando así su señalización inhibitoria intracelular (Ha et al., 2013). Por lo tanto, también utilizaremos nuestras células SIRPA-GFP para analizar si la infección viral promueve la clusterización de SIRPA, su asociación a balsas lipídicas y la modulación de su actividad inhibitoria.

En el curso de una infección viral, el hospedero debe establecer una respuesta inmune vigorosa para limitar la replicación y diseminación y, a su vez, evitar efectos secundarios patológicos asociados a la activación exacerbada de esta respuesta (Chaudhary et al., 2023). Cuando el hospedero no logra controlar la infección y la carga viral es muy elevada, se

genera una hiperactivación del sistema inmune caracterizada por una producción rápida y masiva de varias citoquinas, incluyendo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- α , IFN- β , e IFN- γ que generan daño tisular y falla multiorgánica. Para proteger a las células/tejidos de respuestas inmunes patológicas existen, por lo tanto, mecanismos de regulación negativa para mantener la homeostasis celular durante infecciones (Tang et al., 2021; Chaudhary et al., 2023). En este sentido, se ha propuesto que SIRPA regula negativamente la producción de IFN- β en células A549 frente a infección por el virus de la Hepatitis E (HEV) (Huang et al., 2016) y de las citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 e IL-12 en macrófagos tras su estimulación con LPS y poly(I:C) (Alblas et al., 2005; Miyake et al., 2008; Kim et al., 2013; Lin et al., 2023). Para determinar si SIRPA tiene una función regulatoria en la señalización inmune innata frente a infecciones virales, analizamos componentes de la respuesta autónoma antiviral y de la respuesta inflamatoria en células SIRPA KD. Específicamente, cuantificamos la expresión de IFN-I (IFN- β) y de quimioquinas antivirales (CXCL10 y CCL5) en células infectadas con MAYV y transfectadas con poly(I:C) a distintos intervalos (8 y 48 h). En ambos casos, observamos que la expresión de IFN- β y de las quimioquinas fue significativamente mayor bajo el silenciamiento de SIRPA, indicando que SIRPA modularía negativamente la expresión de estas citoquinas antivirales (Figura 11 y 12). Varios trabajos han demostrado que la severidad de las infecciones por JUNV, CHIKV, DENV y SARS-CoV se relaciona al aumento de los niveles séricos de IFN-I y quimioquinas (Srikiatkachorn et al., 2017; Mantlo et al., 2019; Sun et al., 2019; Chirathaworn et al., 2020; Ramasamy et al., 2021). Particularmente, las alteraciones endoteliales causantes de la patología hemorrágica en infecciones graves por JUNV se caracterizan por la expresión elevada de las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1 (Grant et al., 2012), cuya expresión se regula positivamente por los IFN-I (Lechleitner et al., 1998; Hakansson et al., 2004; Kobayashi et al., 2008). Nuestros resultados sugieren, por tanto, que SIRPA podría contribuir a regular la homeóstasis celular y prevenir la producción exacerbada de citoquinas antivirales, representando una nueva función inhibitoria de SIRPA durante infecciones virales.

Con el objetivo de analizar si SIRPA también pudiera regular la expresión de mediadores de la respuesta inflamatoria en macrófagos frente a infección viral, analizamos las

citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 en macrófagos derivados de monocitos THP-1 infectados con JUNV-C1 y transfectados con poly(I:C) como control. En este caso, no observamos diferencias en la expresión de estas citoquinas durante la infección por JUNV-C1 ni la estimulación de RLRs, indicando que la expresión de SIRPA no modula la producción de citoquinas proinflamatorias en estas condiciones (Figura 14). También se ha reportado que SIRPA regula negativamente la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1 proinflamatorio, promoviendo el fenotipo M2 asociado a respuestas antiinflamatorias, homeostasis y reparación de tejidos bajo diversos estímulos inflamatorios (Zhang et al., 2013; Lin et al., 2018; Shi et al., 2023; Feng et al., 2023). Para evaluar si SIRPA modula la polarización de macrófagos en el contexto de infección viral, infectamos BMDMs de ratones WT y Sirpa KO con JUNV-C1 y analizamos la expresión del marcador de macrófagos M1 CD86 a las 48 hpi. Sin embargo, no detectamos un aumento en la expresión del marcador CD86 en los macrófagos infectados con JUNV-C1 (Figura 15), por lo cual actualmente estamos trabajando en poner a punto un protocolo de infección incluyendo virus murinos, como ser LCMV, para promover la polarización al fenotipo M1 y posteriormente analizar el rol de SIRPA en este proceso.

Dado que determinamos que SIRPA regula negativamente la producción de IFN- β durante la infección por MAYV, a continuación, analizamos cual vía de señalización de IFN-I podría ser modulada por su actividad. En primer lugar, analizamos la producción de IFN- β en células KD para TRIF, proteína adaptadora principal de la señalización de TLR3, y para el receptor citosólico RIG-I infectadas por MAYV. En la Figura 13 se observa que el KD de RIG-I disminuyó drásticamente la producción de IFN- β a las 48 hpi, mientras que no hubo diferencias en la expresión de esta citoquina en células TRIF KD respecto a células CTRL, indicando que la señalización mediada por RIG-I es responsable de promover mayoritariamente la expresión de IFN-I durante la infección por MAYV. Mediante la co-transfección de siSIRPA y siRIG-I también demostramos que la señalización inhibitoria de SIRPA en la vía del IFN- β no es dependiente de RIG-I, debido a que observamos un aumento en la expresión de IFN- β en células SIRPA KD independientemente de los niveles de expresión de RIG-I (Figura 13). Si bien determinamos que TRIF no está involucrada en la

respuesta de IFN-I en la infección por MAYV, la señalización de otros RLRs, como el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (Mda5) (del inglés *melanoma differentiation-associated protein 5*) y el gen laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2) (del inglés *laboratory of genetics and physiology 2*) (Matsumiya et al., 2012), podría ser regulada por la actividad de SIRPA. En este sentido, nos encontramos actualmente analizando la producción de IFN-I en células SIRPA/Mda5 KD frente a infecciones virales y transfección de poly(I:C).

Un aspecto general de las funciones inhibitorias de SIRPA descritas por nuestro grupo y otros autores, es que éstas son dependientes de la señalización negativa iniciada por la fosforilación de tirosina de sus ITIMs (Tsai y Discher et al, 2008; Sarute et al, 2021). Las SFKs fosforilan cientos de sustratos proteicos, incluyendo a SIRPA, regulando una amplia variedad de procesos celulares (Shi et al., 2023). En nuestros ensayos demostramos por primera vez que la infección viral promueve la fosforilación temprana de SIRPA por SFKs, la cual se encuentra fosforilada a bajos niveles en condiciones basales (Figura 16). Además, mostramos que la interacción con CD47 en cis durante la infección es prescindible para su fosforilación (Figura 16), sugiriendo que el reconocimiento de uno o más componentes virales durante la invasión celular es responsable de la activación y fosforilación de SIRPA. Respecto a las fosfatasa de tirosina que se unen a SIRPA, se ha propuesto que SHP-1 tiene un rol principalmente inhibitorio en la señalización inmune y SHP-2 un rol activador, aunque estas funciones son más complejas y multifactoriales que lo sugerido. Por ejemplo, se ha reportado que SHP-1 puede reducir la inflamación regulando negativamente la transcripción de quimioquinas (Forget et al., 2005), IFN-I (Massa et al., 1996; Min et al., 1998), y TNF- α , IL-6 e IL1- β (Rego et al., 2011) bajo inflamación y a su vez, la producción de IFN- β y CXCL10 durante infecciones por el virus herpes simplex-1 (HSV-1) y VSV (Hao et al., 2020). Contrariamente, An y cols (2008) reportaron que SHP-1 regula positivamente la producción de IFN-I dependiente de la señalización de TLRs y RIG-I (An et al., 2008). A su vez, SHP-2 también puede ejercer funciones tanto inhibitorias como activadoras de la respuesta antiviral (Chong et al., 2007). En nuestros ensayos, determinamos que SHP-1 no está implicada en la modulación de la expresión de IFN- β por SIRPA durante infecciones

virales ni estimulaciones de RLRs en células A549, utilizando un inhibidor selectivo de SHP-1 (TPI-1) en células SIRPA KD (Figura 16). Si bien SHP-1 se expresa moderadamente en células A549, esta fosfatasa es expresada principalmente por células hematopoyéticas y sus funciones inhibitorias se han descrito en células de este linaje (Kim et al., 2013; Feng et al., 2023). Por tanto, para establecer efectivamente el rol de SHP-1 en la señalización negativa de SIRPA en la respuesta antiviral, realizamos los mismos estudios en macrófagos derivados de THP-1 y determinamos que, si bien SHP-1 regula negativamente la producción de IFN- β , la señalización mediada por SIRPA también es independiente de SHP-1 en este tipo celular (Figura 16). Debido a que SHP-2 se expresa en niveles elevados en la mayoría de los tipos celulares, posteriormente analizaremos el rol de esta fosfatasa en la señalización dependiente de SIRPA durante infecciones virales en células epiteliales y mieloides.

Una característica de los factores de la inmunidad intrínseca es que aumentan sus niveles de expresión durante las infecciones virales estableciendo un mecanismo de retroalimentación positiva (Yan y Chen, 2012). Aquí, determinamos que la infección con JUNV-C1, ZIKV, MAYV y YFV-17D aumenta los niveles de expresión de SIRPA a las 8 y/o 48 hpi en células A549 (Figura 17). Sin embargo, este incremento en la expresión es independiente de la señalización de los receptores de IFN-I/IFN-II (Figura 17), indicando que el locus de SIRPA no contiene elementos ISRE ni GAS, característicos de genes estimulados por interferón del tipo I y II, respectivamente. En este sentido, un estudio reciente reportó que la proteína Elk-1, con un dominio ETS, es un factor de transcripción para SIRPA (Wang et al., 2020). Actualmente, estamos investigando si el aumento en la expresión de SIRPA ante infecciones virales podría estar regulada por la actividad de Elk1.

9. CONCLUSIÓN y PERSPECTIVAS

En esta tesis demostramos que SIRPA limita la infección por flavivirus y togavirus no analizados previamente, confirmando la marcada actividad antiviral de este factor de la inmunidad intrínseca contra diversas familias virales. La expresión constitutiva de SIRPA en distintos tipos celulares permite que pueda actuar inmediatamente tras una infección viral para reducir los niveles de infección. Aquí, aportamos nuevos elementos sobre su regulación, mostrando que su expresión aumenta significativamente durante las infecciones virales, lo cual contribuiría a impedir la diseminación viral a otras células/tejidos.

Además, describimos un nuevo rol inhibitorio para SIRPA durante infecciones virales, al demostrar que su señalización regula negativamente la expresión de IFN-I y de quimioquinas antivirales dependiente de RLRs, citoquinas características de la respuesta autónoma antiviral. Sin embargo, su expresión no fue inducida por el tratamiento con IFN-I/II, indicando que su regulación en la vía de IFN-I podría iniciarse cuando los componentes virales son reconocidos por RLRs.

Conocer los mecanismos involucrados en la actividad negativa de SIRPA en infecciones virales, nos permitirá comprender mejor los complejos procesos involucrados en la entrada viral e inmunopatología, abriendo nuevas alternativas para el desarrollo de terapias antivirales e inmunomoduladoras contra virus emergentes y re-emergentes (Figura 19).

En base a nuestros resultados, proponemos el siguiente modelo:

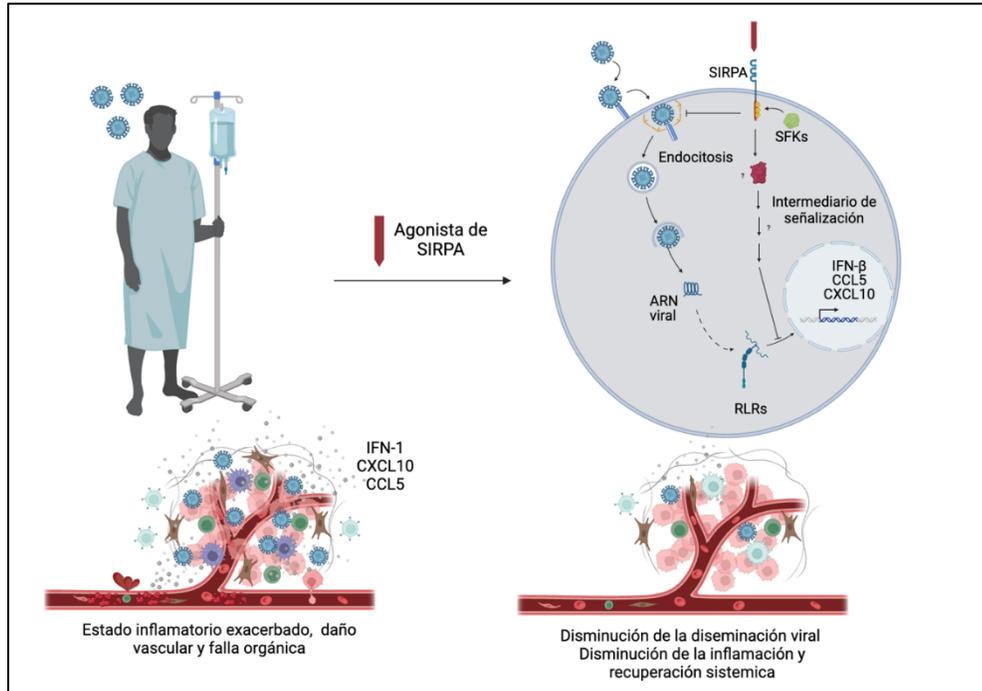


Figura 19. Las respuestas inmunológicas ineficientes frente a infecciones virales contribuyen a la replicación y diseminación viral en el hospedero. El aumento en la carga antigénica viral, sumado al daño tisular, generan un estado inflamatorio descontrolado, caracterizado por respuestas exacerbadas de IFN-I y quimioquinas que pueden generar daño vascular y fallas orgánicas. El desarrollo de terapias basadas en moléculas agonistas de SIRPA limitaría la entrada y replicación viral, contribuyendo a prevenir la diseminación y la eliminación del patógeno. A su vez, la activación de SIRPA regularía la expresión de IFN-I y quimioquinas, procurando restaurar la funcionalidad de la respuesta autónoma antiviral y prevenir daños tisulares. Creado en Biorender®

10.REFERENCIAS

Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat?. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 163. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>

Aguilar-Briseño, J. A., Upasani, V., Ellen, B. M. T., Moser, J., Pauzuolis, M., Ruiz-Silva, M., Heng, S., Laurent, D., Choeung, R., Dussart, P., Cantaert, T., Smit, J. M., & Rodenhuis-Zybert, I. A. (2020). TLR2 on blood monocytes senses dengue virus infection and its expression correlates with disease pathogenesis. *Nature communications*, 11(1), 3177. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16849-7>

Alblas, J., Honing, H., de Lavalette, C. R., Brown, M. H., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2005). Signal regulatory protein alpha ligation induces macrophage nitric oxide production through JAK/STAT- and phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1/NAPDH oxidase/H2O2-dependent pathways. *Molecular and cellular biology*, 25(16), 7181–7192. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7181-7192.2005>

An, H., Hou, J., Zhou, J. et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat Immunol* 9, 542–550 (2008). <https://doi.org/10.1038/ni.1604>

Asper, M., Sternsdorf, T., Hass, M., Drosten, C., Rhode, A., Schmitz, H., & Günther, S. (2004). Inhibition of different Lassa virus strains by alpha and gamma interferons and comparison with a less pathogenic arenavirus. *Journal of virology*, 78(6), 3162–3169. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.6.3162-3169.2004>

Azar, S. R., Campos, R. K., Bergren, N. A., Camargos, V. N., & Rossi, S. L. (2020). Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. *Microorganisms*, 8(8), 1167. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081167>

Banete, A., Barilo, J., Whittaker, R., & Basta, S. (2022). The Activated Macrophage - A Tough Fortress for Virus Invasion: How Viruses Strike Back. *Frontiers in microbiology*, 12, 803427. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.803427>

Barclay, A. N., & Brown, M. H. (2006). The SIRP family of receptors and Immune Regulation. *Nature Reviews Immunology*, 6(6), 457–464. <https://doi.org/10.1038/nri1859>

Barclay, A. N., & van den Berg, T. K. (2014). The interaction between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRPA) and CD47: Structure, function, and therapeutic target. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 25–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120142>

Borrow, P., Martínez-Sobrido, L., & de la Torre, J. C. (2010). Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection. *Viruses*, 2(11), 2443–2480. <https://doi.org/10.3390/v2112443>

Boutayeb A. (2010). The Burden of Communicable and Non-Communicable Diseases in Developing Countries. *Handbook of Disease Burdens and Quality of Life Measures*, 531–546. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78665-0_32

Carpentier, K. S., & Morrison, T. E. (2018). Innate immune control of alphavirus infection. *Current opinion in virology*, 28, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.11.006>

Chan, Y. K., & Gack, M. U. (2016). Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nature reviews. Microbiology*, 14(6), 360–373. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.45>

Chaudhary, R., Meher, A., Krishnamoorthy, P., & Kumar, H. (2023). Interplay of host and viral factors in inflammatory pathway mediated cytokine storm during RNA virus infection. *Current research in immunology*, 4, 100062. <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2023.100062>

Chirathaworn, C., Chansaenroj, J., & Poovorawan, Y. (2020). Cytokines and Chemokines in Chikungunya Virus Infection: Protection or Induction of Pathology. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(6), 415. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060415>

Chong, Z. Z., & Maiese, K. (2007). The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histology and histopathology*, 22(11), 1251–1267. <https://doi.org/10.14670/HH-22.1251>

Christophi, G. P., & Massa, P. T. (2009). Central neuroinvasion and demyelination by inflammatory macrophages after peripheral virus infection is controlled by SHP-1. *Viral immunology*, 22(6), 371–387. <https://doi.org/10.1089/vim.2009.0052>

Chuong, C., Bates, T. A., & Weger-Lucarelli, J. (2019). Infectious cDNA clones of two strains of Mayaro virus for studies on viral pathogenesis and vaccine development. *Virology*, 535, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.013>

Clegg, J. C. (2009). Influence of climate change on the incidence and impact of arenavirus diseases: A speculative assessment. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(6), 504–509. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02847.x>

Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic acids research*, 46(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>

Cron, R. Q., Goyal, G., & Chatham, W. W. (2023b). Cytokine storm syndrome. *Annual Review of Medicine*, 74(1), 321–337. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042921-112837>

Cuevas, C. D., Lavanya, M., Wang, E., & Ross, S. R. (2011). Junin virus infects mouse cells and induces innate immune responses. *Journal of virology*, 85(21), 11058–11068. <https://doi.org/10.1128/JVI.05304-11>

Dahiya, N., Yadav, M., Singh, H., Jakhar, R., & Sehrawat, N. (2023). ZIKV: Epidemiology, infection mechanism and current therapeutics. *Frontiers in Tropical Diseases*, 3. <https://doi.org/10.3389/fitd.2022.1059283>

de Lima Cavalcanti, T. Y. V., Pereira, M. R., de Paula, S. O., & Franca, R. F. O. (2022). A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses*, 14(5), 969. <https://doi.org/10.3390/v14050969>

Decker, T., Kovarik, P., & Meinke, A. (1997). GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 17(3), 121–134. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.121>

Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2022). Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in immunology*, 13, 812774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>

Dutta, S. K., & Langenburg, T. (2023). A Perspective on Current Flavivirus Vaccine Development: A Brief Review. *Viruses*, 15(4), 860. <https://doi.org/10.3390/v15040860>

El-Bacha T, Menezes MMT, Azevedo Silva MC, Sola-Penna M, Da Poian AT (2004) Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Mol. Cell. Biochem* 266(12):191–198. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049154.17866.00>

Feng, Y., Huang, C., Wang, Y., & Chen, J. (2023). SIRPA: A key player in innate immunity. *European Journal of Immunology*, 53(11). <https://doi.org/10.1002/eji.202350375>

Flórez-Álvarez, L., de Souza, E. E., Botosso, V. F., de Oliveira, D. B. L., Ho, P. L., Taborda, C. P., Palmisano, G., Capurro, M. L., Pinho, J. R. R., Ferreira, H. L., Minoprio, P., Arruda, E., de Souza Ferreira, L. C., Wrenger, C., & Durigon, E. L. (2022). Hemorrhagic fever viruses: Pathogenesis, therapeutics, and emerging and re-emerging potential. *Frontiers in microbiology*, 13, 1040093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1040093>

Forget, G., Matte, C., Siminovitch, K. A., Rivest, S., Pouliot, P., & Olivier, M. (2005). Regulation of the leishmania-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *European Journal of Immunology*, 35(6), 1906–1917. <https://doi.org/10.1002/eji.200526037>

Girdhar, K., Powis, A., Raisingani, A., Chrudinová, M., Huang, R., Tran, T., Sevgi, K., Dogus Dogru, Y., & Altindis, E. (2021). Viruses and Metabolism: The Effects of Viral Infections and Viral Insulins on Host Metabolism. *Annual review of virology*, 8(1), 373–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-102416>

Grant, A., Seregin, A., Huang, C., Kolokoltsova, O., Brasier, A., Peters, C., & Paessler, S. (2012). Junín virus pathogenesis and virus replication. *Viruses*, 4(10), 2317–2339. <https://doi.org/10.3390/v4102317>

Ha, B., Lv, Z., Bian, Z., Zhang, X., Mishra, A., & Liu, Y. (2013). 'Clustering' SIRP α into the plasma membrane lipid microdomains is required for activated monocytes and macrophages to mediate effective cell surface interactions with CD47. *PloS one*, 8(10), e77615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077615>

Håkansson, A., Gustafsson, B., Krysanter, L., Hjelmqvist, B., Rettrup, B., & Håkansson, L. (1999). Expression of ICAM-1 during IFN-alpha-based treatment of metastatic malignant melanoma: relation to tumor-infiltrating mononuclear cells and regressive tumor

changes. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 19(2), 171–177. <https://doi.org/10.1089/107999099314315>

Haller, O., & Kochs, G. (2020). Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission. *Human genetics*, 139(6-7), 695–705. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02092-8>

Hao, D., Wang, Y., Li, L., Qian, G., Liu, J., Li, M., Zhang, Y., Zhou, R., & Yan, D. (2020). SHP-1 suppresses the antiviral innate immune response by targeting TRAF3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(9), 12392–12405. <https://doi.org/10.1096/fj.202000600RR>

Huang, C., Wang, X., Wang, Y., Feng, Y., Wang, X., Chen, S., Yan, P., Liao, J., Zhang, Q., Mao, C., Li, Y., Wang, L., Wang, X., Yi, W., Cai, W., Chen, S., Hong, N., He, W., Chen, J., & Jin, W. (2024). Sirpα on tumor-associated myeloid cells restrains antitumor immunity in colorectal cancer independent of its interaction with CD47. *Nature cancer*, 5(3), 500–516. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00691-z>

Huang, F., Yang, C., Yu, W., Bi, Y., Long, F., Wang, J., Li, Y., & Jing, S. (2016). Hepatitis E virus infection activates signal regulator protein α to down-regulate type I interferon. *Immunologic research*, 64(1), 115–122. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8729-y>

Jordan, T. X., & Randall, G. (2016). Flavivirus modulation of cellular metabolism. *Current opinion in virology*, 19, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.05.007>

Kang, S., Brown, H. M., & Hwang, S. (2018). Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune network*, 18(5), e33. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e33>

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>

Kim, E. J., Suk, K., & Lee, W. H. (2013). SHPS-1 and a synthetic peptide representing its ITIM inhibit the MyD88, but not TRIF, pathway of TLR signaling through activation of SHP and PI3K in THP-1 cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 62(4), 377–386. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0589-0>

Kobayashi, T., Takaku, Y., Yokote, A., Miyazawa, H., Soma, T., Hagiwara, K., Kanazawa, M., & Nagata, M. (2008). Interferon-beta augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. *The European respiratory journal*, 32(6), 1540–1547. <https://doi.org/10.1183/09031936.00059507>

Lechleitner, S., Gille, J., Johnson, D. R., & Petzelbauer, P. (1998). Interferon enhances tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) expression in human endothelial cells by an interferon-related factor 1-dependent pathway. *The Journal of experimental medicine*, 187(12), 2023–2030. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2023>

Lee, L. N., Burke, S., Montoya, M., & Borrow, P. (2009). Multiple mechanisms contribute to impairment of type 1 interferon production during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(11), 7178–7189. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802526>.

Lin, Y., Zhao, J.-L., Zheng, Q.-J., Jiang, X., Tian, J., Liang, S.-Q., Guo, H.-W., Qin, H.-Y., Liang, Y.-M., & Han, H. (2018). Notch signaling modulates macrophage polarization and phagocytosis through direct suppression of signal regulatory protein α expression. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01744>

Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151.

Macal, M., Lewis, G. M., Kunz, S., Flavell, R., Harker, J. A., & Zúñiga, E. I. (2012). Plasmacytoid dendritic cells are productively infected and activated through TLR-7 early after arenavirus infection. *Cell host & microbe*, 11(6), 617–630. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.017>

Mahish, C., De, S., Chatterjee, S., Ghosh, S., Keshry, S. S., Mukherjee, T., Khamaru, S., Tung, K. S., Subudhi, B. B., Chattopadhyay, S., & Chattopadhyay, S. (2023). TLR4 is one of the receptors for Chikungunya virus envelope protein E2 and regulates virus induced pro-inflammatory responses in host macrophages. *Frontiers in immunology*, 14, 1139808. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1139808>

Mantlo, E., Paessler, S., & Huang, C. (2019). Differential Immune Responses to Hemorrhagic Fever-Causing Arenaviruses. *Vaccines*, 7(4), 138. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040138>

Massa, P. T., & Wu, C. (1996). The role of protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the regulation of IFN-gamma signaling in neural cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(11), 5139–5144.

Matsumiya, T., & Stafforini, D. M. (2010). Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Critical reviews in immunology*, 30(6), 489–513. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v30.i6.10>

McLaughlin, K. M., Bojkova, D., Kandler, J. D., Bechtel, M., Reus, P., Le, T., Rothweiler, F., Wagner, J. U. G., Weigert, A., Ciesek, S., Wass, M. N., Michaelis, M., & Cinatl, J., Jr (2021). A Potential Role of the CD47/SIRPalpha Axis in COVID-19 Pathogenesis. *Current issues in molecular biology*, 43(3), 1212–1225. <https://doi.org/10.3390/cimb43030086>

Min, W., Pober, J. S., & Johnson, D. R. (1998). Interferon induction of TAP1: the phosphatase SHP-1 regulates crossover between the IFN-alpha/beta and the IFN-gamma signal-transduction pathways. *Circulation research*, 83(8), 815–823. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.8.815>

Miyake, A., Murata, Y., Okazawa, H., Ikeda, H., Niwayama, Y., Ohnishi, H., Hirata, Y., & Matozaki, T. (2008). Negative regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 13(2), 209–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01161.x>

Morel, Z., Martínez, T., Galeano, F., Coronel, J., Quintero, L., Jimenez, R., Ayala, J., Amarilla, S., Lovera, D., & Martínez de Cuellar, C. (2024). Cytokine storm in Chikungunya: Can we call it multisystem inflammatory syndrome associated with Chikungunya?. *Reumatologia clinica*, 20(4), 223–225. <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2024.04.005>

Mulay, S. R., & Lech, M. (2022). Editorial: Negative Regulators of Innate Immunity and Their Role in Host Responses to Injury and Infection. *Frontiers in immunology*, 13, 891919. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.891919>

National Library of Medicine, Nacional Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nazmi, A., Dutta, K., Hazra, B., & Basu, A. (2014). Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. *Virus research*, 185, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.013>

Pan, Y., Cai, W., Cheng, A., Wang, M., Yin, Z., & Jia, R. (2022). Flaviviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Frontiers in immunology*, 13, 829433. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.829433>

Pelletier, A.-N., Tomazella, M., de Carvalho, K., Nicolau, A., Marmoratto, M., Silveira, C., Khalil, J., Nakaya, H., Kallas, E., Diamond, M., & Sekaly, R.-P. (2021). Yellow Fever Disease Severity Is Driven by an Acute Cytokine Storm Modulated by an Interplay between the Human Gut Microbiome and the Metabolome. <https://doi.org/10.1101/2021.09.25.21264125>

Powers, A. M., & Roehrig, J. T. (2011). Alphaviruses. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 665, 17–38. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-817-1_2

Radoshitzky, S. R., & de la Torre, J. C. (2019). Human Pathogenic Arenaviruses (Arenaviridae). *Encyclopedia of Virology*, 507–517. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00014-X>

Rai, K. R., Shrestha, P., Yang, B., Chen, Y., Liu, S., Maarouf, M., & Chen, J. L. (2021). Acute Infection of Viral Pathogens and Their Innate Immune Escape. *Frontiers in microbiology*, 12, 672026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.672026>

Ramachandran, I. R., Song, W., Lapteva, N., Seethammagari, M., Slawin, K. M., Spencer, D. M., & Levitt, J. M. (2011). The phosphatase SRC homology region 2 domain-containing phosphatase-1 is an intrinsic central regulator of dendritic cell function. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 186(7), 3934–3945.

Ramasamy, S., & Subbian, S. (2021). Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 34(3), e00299-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00299-20>

Rego, D., Kumar, A., Nilchi, L., Wright, K., Huang, S., & Kozlowski, M. (2011). IL-6 production is positively regulated by two distinct Src homology domain 2-containing tyrosine phosphatase-1 (SHP-1)-dependent CCAAT/enhancer-binding protein β and NF- κ B pathways and an SHP-1-independent NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated bone marrow-

derived macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 186(9), 5443–5456. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003551>

Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian journal of microbiology*, 67(10), 687–702. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>

Roychoudhury, S., Das, A., Sengupta, P., Dutta, S., Roychoudhury, S., Choudhury, A. P., Ahmed, A. B. F., Bhattacharjee, S., & Slama, P. (2020). Viral Pandemics of the Last Four Decades: Pathophysiology, Health Impacts and Perspectives. *International journal of environmental research and public health*, 17(24), 9411. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249411>

Sarute N, Ibrahim N, Medegan Fagla B, Lavanya M, Cuevas C, Stavrou S, Otkiran-Clare G, Tynnismaa H, Henao-Mejia J, Ross SR. TRIM2, a novel member of the antiviral family, limits New World arenavirus entry. *PLoS Biol.* 2019 Feb 6;17(2):e3000137. doi: 10.1371/journal.pbio.3000137. PMID: 30726215; PMCID: PMC6380604.

Sarute, N., Cheng, H., Yan, Z., Salas-Briceno, K., Richner, J., Rong, L., & Ross, S. R. (2021). Signal-regulatory protein alpha is an anti-viral entry factor targeting viruses using endocytic pathways. *PLOS Pathogens*, 17(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009662>

Shi, L., Bian, Z., Kidder, K., Liang, H., & Liu, Y. (2021). Non-Lyn Src family kinases activate sirp α -shp-1 to inhibit PI3K-akt2 and dampen proinflammatory macrophage polarization. *The Journal of Immunology*, 207(5), 1419–1427. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100266>

Shrestha, B., Wang, T., Samuel, M. A., Whitby, K., Craft, J., Fikrig, E., & Diamond, M. S. (2006). Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *Journal of virology*, 80(11), 5338–5348. <https://doi.org/10.1128/JVI.00274-06>

Silva-Ramos, C.R., Mejorano-Fonseca, J.A., Hidalgo, M. et al. (2023). Clinical, Epidemiological, and Laboratory Features of Mayaro Virus Infection: a Systematic Review. *Curr Trop Med Rep* . <https://doi.org/10.1007/s40475-023-00308-6>

Srikiatkachorn, A., Mathew, A., & Rothman, A. L. (2017). Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Seminars in immunopathology*, 39(5), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0625-1>

Stott, R. J., Strecker, T., & Foster, T. L. (2020). Distinct Molecular Mechanisms of Host Immune Response Modulation by Arenavirus NP and Z Proteins. *Viruses*, 12(7), 784. <https://doi.org/10.3390/v12070784>

Sun, E., He, J., & Zhuang, X. (2013). Live cell imaging of viral entry. *Current opinion in virology*, 3(1), 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.01.005>

Sun, L., Liu, S., & Chen, Z. J. (2010). SnapShot: pathways of antiviral innate immunity. *Cell*, 140(3), 436–436.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.041>

Sun, X., Wang, T., Cai, D., Hu, Z., Chen, J., Liao, H., Zhi, L., Wei, H., Zhang, Z., Qiu, Y., Wang, J., & Wang, A. (2020). Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. *Cytokine & growth factor reviews*, 53, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.04.002>

Tang, X. D., Ji, T. T., Dong, J. R., Feng, H., Chen, F. Q., Chen, X., Zhao, H. Y., Chen, D. K., & Ma, W. T. (2021). Pathogenesis and Treatment of Cytokine Storm Induced by Infectious Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 13009. <https://doi.org/10.3390/ijms222313009>

Taniguchi, T., & Takaoka, A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Current opinion in immunology*, 14(1), 111–116. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(01\)00305-3](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(01)00305-3)

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1843(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>

Tsai, R. K., & Discher, D. E. (2008). Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *The Journal of cell biology*, 180(5), 989–1003. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708043>

Valdés-López, J. F., Fernandez, G. J., & Urcuqui-Inchima, S. (2022). Synergistic Effects of Toll-Like Receptor 1/2 and Toll-Like Receptor 3 Signaling Triggering Interleukin 27 Gene

Expression in Chikungunya Virus-Infected Macrophages. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 812110. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.812110>

Wang, X., Luo, X., Chen, C., Tang, Y., Li, L., Mo, B., Liang, H., & Yu, S. (2020). The Ap-2 α /Elk-1 axis regulates Sirp α -dependent tumor phagocytosis by tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 35. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0124-z>

Wu, J. Q., Barabé, N. D., & Chau, D. (2019). Effect of exogenous expression of IFN- γ on the new world alphavirus replication and Infection. *Future Virology*, 14(9), 593–604. <https://doi.org/10.2217/fvl-2019-0073>

Yan, N., & Chen, Z. J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. *Nature immunology*, 13(3), 214–222. <https://doi.org/10.1038/ni.2229>

Zeng, W., Sun, L., Jiang, X., Chen, X., Hou, F., Adhikari, A., Xu, M., & Chen, Z. J. (2010). Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell*, 141(2), 315–330. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.029>

Zhang, X., Bogunovic, D., Payelle-Brogard, B., Francois-Newton, V., Speer, S. D., Yuan, C., Volpi, S., Li, Z., Sanal, O., Mansouri, D., Tezcan, I., Rice, G. I., Chen, C., Mansouri, N., Mahdavian, S. A., Itan, Y., Boisson, B., Okada, S., Zeng, L., ... Pellegrini, S. (2014, October 12). Human intracellular ISG15 prevents interferon- α/β over-amplification and auto-inflammation. *Nature News*. <https://www.nature.com/articles/nature13801>

Zhang, Y., Sime, W., Juhas, M., & Sjölander, A. (2013). Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 49(15), 3320–3334. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.005>

11.ANEXO

11.1 *Estudio del metabolismo de células SIRPA KD y CTRL en el Agilent Seahorse®*

En el ensayo de estrés celular, el OCR inicial indica la respiración basar celular (total de oxígeno consumido por la mitocondria) (Figura 5A). Al inyectarle oligomicina, un inhibidor de la síntesis de ATP, se logra medir indirectamente la cantidad de oxígeno utilizado para la producción de ATP (equivalente a la disminución de la producción de oxígeno medida). Luego, las células se tratan con Cianuro de carbonilo-4 (trifluorometoxi) (FCCP), un protonóforo (permite que los protones se filtren por la membrana). Por consiguiente, la célula aumenta al máximo su consumo de oxígeno para compensar la pérdida de gradiente de protones y la medida del OCR permite evaluar la capacidad respiratoria máxima (lo máximo de oxígeno que puede consumir la célula). Finalmente, la Rotenona y antimicina A inhiben la cadena de transporte de electrones y por lo tanto la medición final de oxígeno se puede atribuir al consumo de oxígeno independiente a la mitocondria.

Para evaluar la actividad glucolítica celular, el instrumento mide directamente la tasa de acidificación (ECAR) (Figura 5B). Primero, las células se incuban en el medio sin glucosa ni piruvato y se mide el ECAR; debido a que la célula se depleta de sustratos derivados de la glicólisis para la cadena de transporte de electrones, la acidificación medida deriva de reacciones no glucolíticas (acidificación no glucolítica). Luego, se inyecta una concentración saturante de glucosa, aumentando la producción de protones lo que informando la tasa de glicólisis basal. A continuación, la inyección de oligomicina inhibe la producción de ATP mitocondrial, lo que resulta en estrés celular y un aumento consecuente de la glicolisis. Por lo tanto, el ECAR revela la capacidad glucolítica máxima celular. Finalmente, la inyección de 2-DG, un análogo de la glucosa inhibe la glicólisis a través de la unión competitiva con la glucosa hexoquinasa, la primera enzima en la vía glucolítica, y la disminución resultante en ECAR confirma que el ECAR producido en el experimento se debe a la glicólisis. La diferencia entre la capacidad glucolítica y la tasa de glicólisis define la capacidad glucolítica de reserva.

En cuanto al procedimiento experimental, se hidrató el cartucho del calibrador Seahorse XF a 37 °C en una incubadora sin CO₂ durante la noche. En paralelo, se sembraron en la microplaca de 96 pocillos de cultivo celular Seahorse XF 10.000 células por pocillo de A549 transfectadas previamente por 24 h con los RNA interferente para SIRPA o CTRL. Al otro día se prepararon los medios de GlicoStress (DMEM Glucosa 25mM, Piruvato 1mM y Glutamato 2mM) y MitoStress (DEMEM Glutamina 2mM). Luego se lavaron 3 veces las células de cada experimento con los medios correspondientes y se añadió 180ul de medio en cada pocillo. Las células se dejaron reposar a 37 °C sin CO₂ por 1 hora. Mientras, se cargaron en el cartucho las soluciones para los ensayos de MitoStress (OCR) (Oligomicina 2µM, FCCP µM y AAR 1µM en medio MitoStress) y las soluciones para los ensayos de GlicoStress (ECAR) (Glucosa 25mM, Oligomicina 2 µM y 2DG 50mM en medio GlicoStress). El cartucho se montó en la placa celular y se analizaron por el equipo Agilent Seahorse XF®. Al finalizar el análisis, se lisaron las células con buffer RIPA y se cuantificó la concentración proteica de los lisados mediante el ensayo de Bradford utilizando el reactivo Pierce™ Bradford Protein Assay Kit (Thermo). Estos valores se utilizaron para normalizar las lecturas del ECAR y OCR.

11.2 Silenciamiento de genes mediante RNA pequeño de interferencia (siRNA) utilizando el reactivo RNAiMax (Thermo): formato placa de 24 pocillos

Para las células A549, el primer día, se sembraron 50.000 células en cada pocillo y el segundo día se realizó la transfección utilizando medio DMEM 10% SFB, 1% P/S. Para los macrófagos THP1, el primer día se diferenciaron 250.000 monocitos THP1 a macrófagos por cada pocillo como indicado en metodología y el segundo día se realizó la transfección utilizando medio RPMI 10% SFB, 1% P/S, sin PMA.

Para cada pocillo a transfectar, preparar complejos siRNA- Lipofectamina RNAi Max Transfection Reagent

1. Diluir 1 µl de siRNA (10 µM) en 25 µl de medio Opti-MEM sin (SFB).
2. Por separado, diluir 1.5 µl de Lipofectamina en 25 µl de medio Opti-MEM sin (SFB)
3. Mezclar ambas diluciones e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
4. Mientras, agregar 500 µl de medio fresco a las células.

5. Agregar por goteo los 50 μ l de la dilución Lipofectamina-siRNA a las células y mezclar moviendo la placa.
6. Incubar las células por 48 h a 37°C, CO₂ 5%.

11.3 Aislamiento de RNA total de células con el kit Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek):

1. Remover el medio y agregar 350 μ l de buffer de lisis (RL). Mezclar bien con pipeta y agitar la placa por 5 min.
2. Transferir el lisado celular a un tubo de 1.5 ml y agregar 200 μ l de etanol absoluto. Mezclar por vortex 10 s.
3. Colocar las columnas de purificación en los tubos colectores (2 ml) y transferir la mezcla del lisado y etanol. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min y descartar el líquido del colector.
4. Agregar 400 μ l de buffer de lavado (WS) a la columna. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min y descartar el líquido del colector.
5. Realizar un segundo lavado repitiendo el paso 4.
6. Centrifugar las columnas a 13.000 rpm por 2 min para secar la resina y transferir la columna a un tubo de 1.5 ml.
7. Agregar 40 μ l de ddH₂O al centro de la columna y centrifugar a 2000 rpm por 2 min, seguido de 1 min a 14.000 rpm.
8. Descartar la columna y pasar el tubo de 1.5 ml con el RNA a hielo o guardar a -80°C hasta su uso.

11.4 Reacción de retrotranscripción (RT)

1. Preparar los Mix de reacción

Mix 1:

- ARN (50-100 ng) 5 μ l
- Hexámeros al azar (50 ng) 1 μ l
- ddH₂O: Hasta 11 μ l

Mix 2 :

- Buffer RevertAid 5x 4 μ l
 - dNTPs (10 mM) 2 μ l
 - H₂O 1.5 μ l
 - Revert Aid 0.5 μ l
2. Incubar el Mix 1 a 65°C por 5 minutos
 3. En hielo, agregar 8 μ l del Mix 2
 4. Mazclar suavemente por pipeteo
 5. Incubar a 25 °C por 5 minutos seguido por 60 min a 42°C y finalizar la reacción de termociclado incubando 5 minutos a 70°C.

11.5 Reacción de PCR cuantitativa (qPCR)

1. Para cada reacción preparar:
 - Master mix (SYBR green) (2X) 5 μ l
 - Primer Forward (10 μ M) 0.2 μ l (Tabla S1)
 - Primer Reverse (10 μ M) 0.2 μ l (Tabla S1)
 - cDNA (100-250 ng/ μ l) 2 μ l
 - ddH₂O 2.6 μ l
2. Termociclar con el siguiente programa: 50 °C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; [95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto] x40 ciclos.

Tabla S1. Secuencias de los primers utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

Gen	Forward	Reverse
GAPDH	CCCCTTCATTGACCTCAACTACA	CGCTCCTGGAGGATGGTGAT
SIRPA	TTCCAGTGCCTTCCAGCCCT	GGTGATGTTACCGATGCCGATG
ZIKV	CAGCAATAGAGACTTCGTGGA	GTAGGCTTCACCTTGTGTTGG
MAYV	AGGACCCAGAGGAACACTAATA	CGATACTCTTTGCCCACTTAC
JUNV-C1	GGGGCAGTTCATTAGCTTCATGC	CAAAGGTAGGTCATGTGGATTGTTGG
TNFa	CAGGCAGTCAGATCATCTTCT	TGAAGAGGACCTGGGAGTAGA
IL6	AGATTCCAAAGATGTAGCCGC	GTCTCCTCATTGAATCCAGATTG

IP10 (CXCL10)	TCAGCACCATGAATCAAA	GCAGGTACAGCGTACAGT
CCL5	CTGTCATCCTCATTGCTACTGCC	AGCACTTGCCACTGGTGTAGA
IFN- β	CATTACCTGAAGGCCAAGGA	CAATTGTCCAGTCCCAGAGG

11.6 Transfección de plásmidos utilizando el reactivo Lipofectamine 3000 (Thermo): formato de placa de 6 pocillos

Para cada pocillo a transfectar, preparar los complejos plásmido-Lipofectamine 3000 en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml:

1. Diluir los plásmidos en 125 μ l de medio Opti-MEM sin SFB y agregar 3 μ l de reactivo P3000 y mezclar con pipeta (tubo A).
2. En otro tubo, diluir 3 μ l de Lipofectamine 3000 en 125 μ l de Opti-MEM sin SFB y mezclar con pipeta (tubo B).
3. Incubar los tubos A y B a temperatura ambiente (TA) por 5 min.
4. Mezclar ambas diluciones e incubar por 15 minutos adicionales a TA antes de sembrar en cada pocillo.