

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

ESTUDIO DEL PAPEL DE Let-7c
EN LA APOPTOSIS DURANTE
LA INFECCIÓN CON DENGUE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
BIÓL. ALÍN PATRICIA ACUÑA ALONZO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY

MÉXICO, D. F.

JUNIO 2013

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de investigación se realizó con el apoyo académico y económico que me otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco.

El trabajo se realizó en los laboratorios del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. Martha Yocupicio Monroy, así como en el laboratorio de la Dra. Rosa Ma. del Ángel del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto SEP-CONACyT 60282) y de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Además agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por la beca otorgada para la impresión y empastado del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Martha Yocupicio Monroy por su tutoría y apoyo brindado en la elaboración de este trabajo, así como sus enseñanzas en el área de virología y biología molecular.

A la Dra., Selene Zárate Guerra por sus comentarios y observaciones a la tesis así como su asesoría en la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Mauricio Castañón Arreola por su apoyo y revisión crítica del presente trabajo.

Al Dr. Juan Ernesto Ludert León por sus comentarios y observaciones sobre la tesis, y su asesoría durante la elaboración de la misma.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por sus observaciones sobre la tesis y el apoyo durante la elaboración del presente trabajo.

A la Dra. Rosa Ma. del Ángel por el apoyo durante la elaboración del presente trabajo. Además agradezco a los miembros de su laboratorio por la ayuda y apoyo brindado.

A mis compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron en la mejor disposición de ayudarme, Manuel, Fer, Roberto y Berenice.

A mis compañeras de generación, en especial a Guyus y Fer por su amistad, motivación y apoyo.

A Myrna y Víctor, mis padres, por su inestimable apoyo, amor y tantos buenos consejos.

A mi hermano Víctor por su amistad, apoyo incondicional y ejemplo a seguir en tantos ámbitos.

A mis abuelos, Urania[†], Miguel[†], Guillermina[†] y Víctor, por su afecto y apoyo incondicional.

A Fer, por su invaluable amistad y enorme apoyo.

A los compañeros de la SMD y del HaTo por su amistad y buenos momentos.

ÍNDICE

	RESUMEN	1
I.	INTRODUCCIÓN.....	2
II.	ANTECEDENTES.....	12
	2.1 MicroRNAs e infección viral.....	12
	2.2 OSMR (receptor de Oncostatina M).....	14
	2.3 Apoptosis.....	17
	2.4 Modulación de la apoptosis por miRNAs.....	20
III.	JUSTIFICACIÓN	22
IV.	OBJETIVOS.....	23
V.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
VI.	METODOLOGÍA.....	27
VII.	RESULTADOS.....	32
VIII.	DISCUSIÓN.....	46
IX.	CONCLUSIONES.....	55
	 BIBLIOGRAFÍA.....	 57
	 ANEXO.....	 68

RESUMEN

La expresión genética en respuesta a estímulos externos puede ser regulada por distintos mecanismos entre los que destaca el silenciamiento genético mediante miRNAs. Se ha descrito que los miRNAs desempeñan un papel muy importante en diversos procesos biológicos, sin embargo la función celular detallada de la mayoría de éstos es aún desconocida.

Aunque se ha establecido que los miRNAs son reguladores críticos de la apoptosis, y que en la infección por dengue en diversos tipos celulares se modula este proceso, no se conoce el papel que pueden estar jugando los miRNAs. Se han identificado varios miRNAs que muestran alteraciones en su expresión tras la infección con virus dengue, uno de éstos, Let-7c, se induce fuertemente.

En este estudio se evaluó la modulación de apoptosis en respuesta a la infección con virus dengue y a la transfección del miRNA Let-7c en una línea celular humana que representa un blanco natural de la infección por dicho virus. Además, se decidió estudiar una de las proteínas blanco del miRNA Let-7c que podría estar implicada en la apoptosis, el receptor de Oncostatina M (OSMR). Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones de nuestros ensayos no existe modulación de la apoptosis ante la infección, sugiriendo que en la línea celular analizada existen mecanismos celulares y/o virales que inhiben el aumento de la apoptosis en las células infectadas. Por otro lado, ante el aumento exógeno de la expresión del miRNA Let-7c tampoco observamos diferencias en los niveles de células en apoptosis. Así, los resultados sugieren que Let-7c no tiene un efecto directo en el porcentaje de células apoptóticas o que se induce otro mecanismo que bloquea la apoptosis. Al analizar el nivel de expresión de OSMR se observó que éste disminuye significativamente a las 12 h postinfección, y también después de la transfección de Let-7c. Por lo anterior, se sugiere que la disminución de la proteína OSMR ante la infección con virus dengue podría deberse, al menos en parte, a la acción del miRNA Let-7c que aumenta en condiciones de infección.

INTRODUCCIÓN

Infección por el virus del dengue

El virus del dengue produce un espectro de enfermedades con síntomas que varían desde una fiebre moderada hasta una fiebre alta incapacitante (WHO, 2009; Ross, 2010). La fiebre por dengue es un síndrome benigno causado por alguno de la cuatro serotipos del virus del dengue los cuales son transmitidos por artrópodos y se caracteriza por fiebre bifásica, mialgia o artralgia, erupciones, leucopenia y linfadenopatía (Beauvais *et al.*, 1993; Halstead, 2008). La fiebre hemorrágica por dengue (DHF) es una enfermedad febril severa, a menudo fatal, que se caracteriza por anormalidades en la hemostasia y permeabilidad capilar que lleva, en casos severos, a un síndrome de shock con pérdida de proteínas (síndrome de choque por dengue o dengue shock syndrome, DSS) (Halstead, 2008).

En la actualidad, el dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor prevalencia en los humanos (Ross, 2010). Su transmisión es la de más rápida propagación en el mundo y según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009), en los últimos 50 años la incidencia de esta enfermedad se ha incrementado 30 veces debido al aumento en el número de países afectados, y a la expansión de las zonas urbanas a las rurales.

Se estima que anualmente ocurren 50 millones de infecciones con dengue en el mundo (Gubler, 2002; WHO, 2009). En la actualidad, se estima que aproximadamente 2,500 millones de personas están en riesgo de infección por dengue en los países tropicales (Gubler, 2002). Más del 70% de la población en riesgo de infección por dengue se concentra en Asia sudoriental y en la zona del Pacífico occidental (Figura 1) (WHO, 2009).

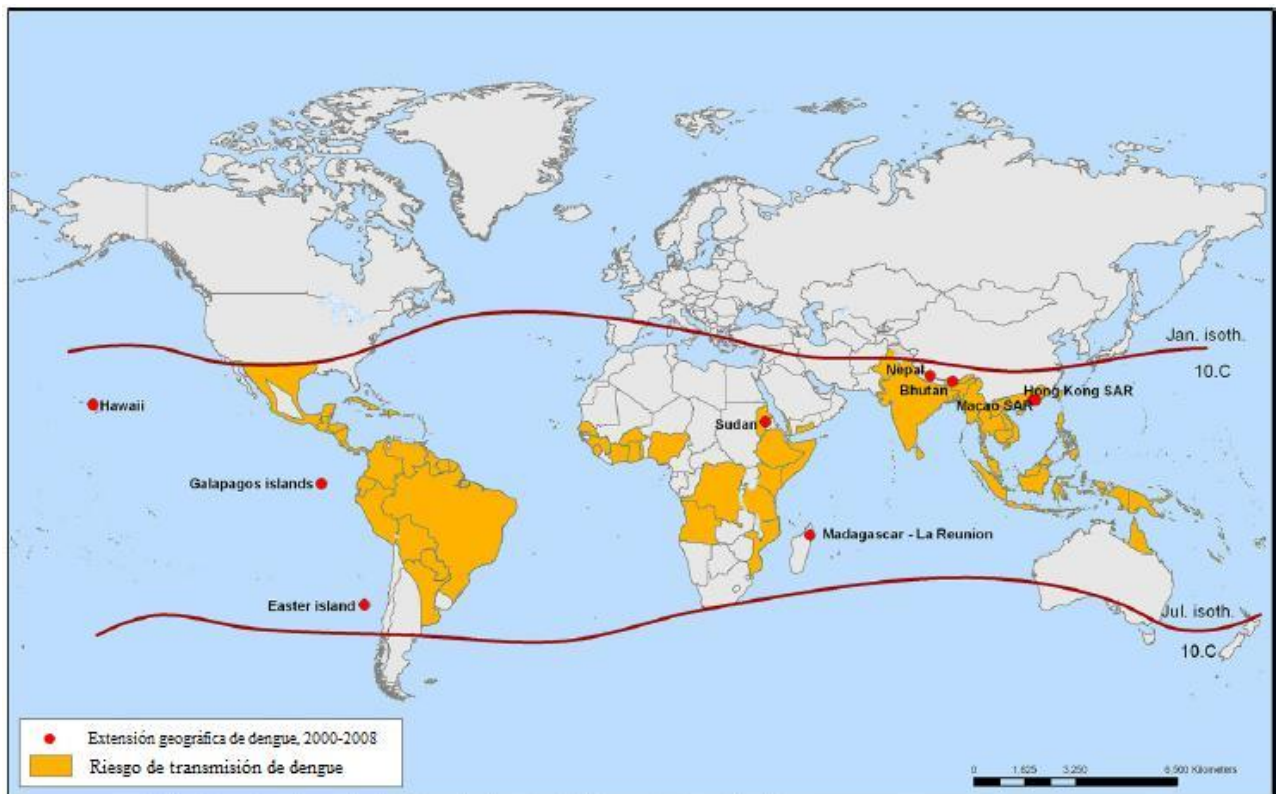


Figura 1. Áreas de riesgo de transmisión de dengue. En el mapa se encuentran marcadas en color amarillo las zonas en riesgo de transmisión de dengue (Modificado de Jansen y Beebe, 2010).

En la mayor parte del continente americano, durante las décadas de 1960 y 1970 hubo una interrupción de la transmisión del dengue como resultado de la campaña de erradicación de *Aedes aegypti*, sin embargo, las medidas de vigilancia y control de vectores no se mantuvieron y ha habido reinfestaciones del mosquito, seguidas por brotes de dengue en el Caribe y en América del Sur y Central (WHO, 2009). De tal manera que el dengue se ha extendido con brotes cíclicos que ocurren cada 3-5 años. Por ejemplo, en 2002 se registró un brote con más de 1 millón de casos notificados. Además, se ha observado que los cuatro serotipos del virus del dengue circulan en la región (WHO, 2009).

Clasificación de los virus del dengue

Existen cuatro miembros antigénicamente diferentes, o serotipos, del subgrupo dengue que se manifiestan con síntomas similares y se denominan dengue 1, dengue 2, dengue 3 y dengue 4 (DENV-1, -2, -3, -4) (Beasley y Barret, 2008; Ross, 2010). Se han identificado distintos linajes dentro de cada serotipo, lo que resalta la gran variabilidad genética del dengue (WHO, 2009). Este virus se mantiene en la naturaleza en dos ciclos de transmisión, el urbano y el selvático. El ciclo urbano, que se considera de mayor importancia epidemiológica, involucra al hombre y a mosquitos del género *Aedes* (Whitehead *et al.*, 2007; Laredo-Tiscareño *et al.*, 2012). Por otro lado, el ciclo selvático involucra primates no humanos y mosquitos *Aedes* (Whitehead *et al.*, 2007).

Se sugiere que el virus humano del dengue ha evolucionado como parásito de primates y que probablemente la dispersión de *Aedes aegypti* desde África hacia el resto del mundo permitió un ciclo de transmisión urbano. Evidencias genéticas sugieren que los cuatro serotipos fueron importados de manera independiente al ciclo urbano durante los últimos 1,000 años. La fiebre amarilla y posiblemente los virus del dengue fueron introducidos al Nuevo Mundo en el siglo XVII como consecuencia del comercio de esclavos africanos (Halstead, 2008).

Generalidades del virus del dengue

El virus dengue pertenece al género *Flavivirus* (arbovirus grupo B), que junto con los géneros *Pestivirus* y *Hepacivirus* conforman la familia *Flaviviridae* (Sayers *et al.*, 2009). Con base en su ecología, los flavivirus se han denominado “arbovirus” (del inglés, arthropod-borne viruses) para denotar el hecho de que muchos se transmiten entre huéspedes vertebrados y mosquitos o garrapatas (Beasley y Barret, 2008). Los distintos serotipos del virus dengue se transmiten a los humanos mediante la picadura de mosquitos *Aedes* (principalmente *Aedes aegypti*), los cuales tienen una amplia distribución geográfica en zonas tropicales y subtropicales (Beasley y Barret, 2008).

El genoma del virus dengue es de RNA de cadena sencilla (sentido positivo) con un tamaño de 10.9 Kb. La estructura del virión es esférica, de 40-50 nm de diámetro y en su superficie contiene las proteínas virales E (envoltura) y M (membrana) (Schmaljohn y McClain, 1996). La glicoproteína E es el principal determinante antigénico en las partículas virales y media la unión y la fusión durante la entrada del virus (Lindenbach *et al.*, 2007).

Se ha observado que el virus dengue se puede unir a distintos receptores de diferentes tipos celulares como células inmunes, endoteliales y del hígado (Lindenbach *et al.*, 2007; Dalrymple y Mackow, 2011). Algunos receptores a los que se une la proteína de envoltura viral son los de tipo Fc, DC-SIGN, ICAM3, CD14, HSP70/90, GRP78, receptor de laminina, y el receptor de manosa (Dalrymple y Mackow, 2011). Además, se ha visto que los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs) también están implicados en la unión del virus dengue en células Vero E6, endoteliales y líneas celulares hepáticas (Lindenbach *et al.*, 2007; Dalrymple y Mackow, 2011).

Después de la unión al receptor, los virus son internalizados vía endocitosis (Figura 2). En el compartimento endocítico, el pH ácido induce la fusión entre la envoltura del virus y la membrana plasmática del hospedero para liberar la nucleocápside viral. Durante esta transición, los dímeros de proteína viral E se disocian en monómeros, y luego se reforman en homotrímeros (Lindenbach *et al.*, 2007). La eficiencia de fusión está influenciada por la composición lipídica de las membranas blanco. El colesterol y el ácido oleico aumentan la fusión, mientras que la liofosfatidilcolina la inhibe (Lindenbach *et al.*, 2007).

La replicación de los virus ocurre en asociación cercana con las estructuras membranales intracelulares inducidas por virus que se re-localizan alrededor de la maquinaria de amplificación de RNA, denominado complejo de replicación (RC), conteniendo proteínas virales, RNA viral, y factores celulares del hospedero (Welsch *et al.*, 2009).

El genoma viral se traduce en el Retículo Endoplasmático rugoso (REr) y codifica una larga poliproteína que se procesa co- y post-traduccionalmente por proteasas virales y del hospedero, para dar lugar a

tres proteínas estructurales (C, prM, y E), y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) que están involucradas en la replicación de RNA, ensamblaje y modulación de la respuesta inmune de la célula hospedera (Welsch *et al.*, 2009; Fischl y Bartenschlager, 2011).

La proteína NS4A, al parecer, junto con otros factores virales y del hospedero induce rearrreglos membranales entre los que se incluyen las vesículas formadas por invaginación de membrana del RE (Fischl y Bartenschlager, 2011). Estas vesículas podrían servir como sitios para la replicación del RNA y están conectadas a través de poros que sirven como salida para el RNA viral de la progenie (Fischl y Bartenschlager, 2011). El RNA se asocia con la proteína de la cápside y en el lumen del RE adquiere una membrana lipídica con heterodímeros de las proteínas E y prM. Posteriormente, estas partículas son transportadas a través de la vía secretora celular, maduras mediante el corte de prM (dependiente de furina) en la red trans-Golgi y finalmente son expulsadas por exocitosis (Clyde *et al.*, 2006; Fischl y Bartenschlager, 2011).

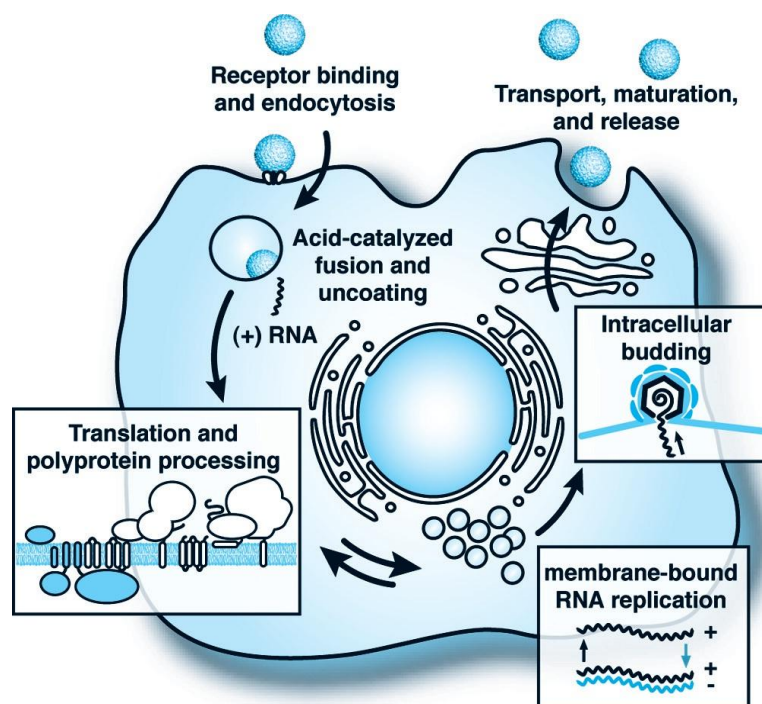


Figura 2. Ciclo replicativo de los virus de la familia *Flaviviridae*. En la imagen se muestran las principales características de la replicación de los virus de la familia *Flaviridae*, a la cual pertenece el virus dengue (Lindenbach *et al.*, 2007).

Interacción con factores celulares

Se sugiere que el virus dengue, al igual que otros virus, puede manipular o explotar componentes de varias vías de señalización del hospedero para evadir la respuesta antiviral y para asegurar un alto nivel de replicación viral y producción de viriones (Fischl y Bartenschlager, 2011).

Se han identificado diversos genes celulares que tienen impacto negativo o positivo en la replicación del virus dengue, éstos incluyen componentes de la vía de degradación asociada al RE (ERAD), el sistema de ubiquitina-proteosoma (UPS), el complejo de adhesión focal y subunidades de la ATPasa vacuolar (vATPase) (Fischl y Bartenschlager, 2011). El sistema de ubiquitina-proteosoma está involucrado en varios procesos celulares como regulación del ciclo celular, reparación del DNA, presentación antigénica, apoptosis, transducción de señales y regulación transcripcional. Aunque el mecanismo molecular no se conoce, se ha observado que la actividad del UPS es necesaria para la traducción y/o replicación del RNA viral (Fischl y Bartenschlager, 2011; Fernández-García *et al.*, 2011).

Se ha observado que en las células infectadas con dengue las proteínas de la cápside se acumulan en la superficie de gotas lipídicas (LDs, por sus siglas en inglés), y se sugiere que éstas tienen un papel indirecto en el ensamblaje de las partículas virales, como podría ser la regulación temporal de la disponibilidad de proteínas de cápside (Fischl y Bartenschlager, 2011). También se ha observado que la infección con dengue induce la degradación de LDs vía autofagia, esto ocurre probablemente para movilizar triglicéridos que se usan para la producción de energía (ATP) vía β -oxidación o para la biosíntesis de ácidos grasos (Fischl y Bartenschlager, 2011).

La infección con virus dengue activa una respuesta a estrés severa (como la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR), así como la respuesta de interferón tipo 1 (causada por RNA viral infectivo o replicativo), lo que lleva a la inducción de genes que controlan la infección (Fischl y Bartenschlager, 2011). Por ejemplo, en células A549, se ha observado que el gen de respuesta a IFN, viperin, se induce ante la

infección con virus dengue y esto resulta en una reducción significativa de la replicación viral (Fink *et al.*, 2007).

MicroRNAs

En los organismos, la expresión de genes en respuesta a estímulos externos e internos puede ser regulada por distintos mecanismos, como factores de transcripción, splicing alternativo, epigenética y silenciamiento genético mediante RNAs pequeños incluyendo los microRNAs (miRNAs) (Wessner *et al.*, 2010).

Los miRNAs son una familia de RNAs no codificantes, de cadena sencilla, con una longitud de 18 a 25 nucleótidos, los cuales se describieron por primera vez en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* siendo *lin-4* y *let-7* los primeros en haber sido identificados (Ambros, 2008). Posteriormente se han detectado un gran número de miRNAs codificados en varios genomas eucariontes (Ambros, 2008).

Los miRNAs regulan la expresión genética a nivel postranscripcional mediante la unión a secuencias complementarias generalmente en la región 3' UTR (región 3' no traducida) de RNAs mensajeros (mRNAs) blanco (Huang *et al.*, 2010). En humanos se han identificado más de 1,600 miRNAs que probablemente regulan el 30-60% de los genes codificantes de proteínas (Wessner *et al.*, 2010).

Los miRNAs son generados a partir de transcritos endógenos y se procesan en una vía de maduración que involucra la actividad de varias enzimas como se puede apreciar en la Figura 3 (Kozlowski *et al.*, 2008).

El gen del miRNA es transcrito generalmente por la RNA polimerasa II, generando un precursor largo o pri-miRNA (miRNA primario) (Ying *et al.*, 2008). Este pri-miRNA se caracteriza por una estructura de *hairpin* que es reconocida por la RNasa III nuclear Drosha, y su cofactor DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8, por sus siglas en inglés). Estas proteínas trabajan con un complejo de varias proteínas denominado Microprocesador que corta el pri-miRNA para generar el pre-miRNA (miRNA precursor), de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud (Huang *et al.*, 2010).

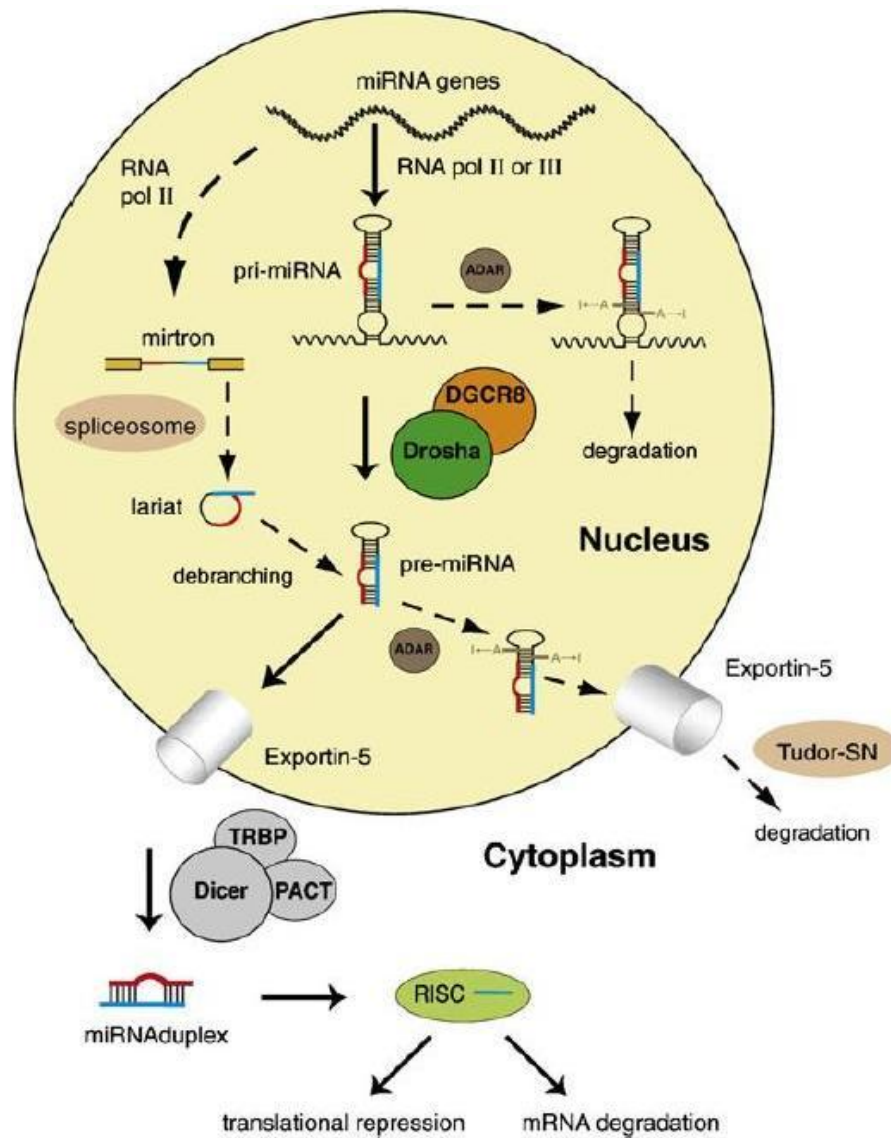


Figura 3. Vía de la biogénesis de los microRNAs. Los miRNAs son generados a partir de transcritos endógenos y posteriormente son procesados en una vía de maduración que implica la actividad de varias enzimas. Finalmente se incorporan al complejo RISC para unirse a su secuencia blanco y llevar a cabo el silenciamiento. (Huang *et al.*, 2010).

También se han descrito precursores alternativos para la biogénesis de los miRNAs denominados Mirtrones. Éstos son intrones cortos con una estructura de hairpin que utilizan el mecanismo de splicing para eludir el corte de Drosha, que de otra forma es esencial para la generación de miRNAs canónicos en animales (Berezikov *et al.*, 2007).

El hairpin del pre-miRNA es reconocido por la Exportina-5 que lo transporta del núcleo al citoplasma (Ying *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010). En el citoplasma la enzima Dicer (RNasa III) junto con la proteína TRBP [trans-activator RNA (tar)-binding protein, por sus siglas en inglés] procesa el pre-miRNA generando un dúplex miR/miR* de aproximadamente 21 nt (Du y Zamore, 2005; Huang *et al.*, 2010).

Finalmente, una cadena del dúplex (miRNA maduro) se incorpora preferencialmente al complejo silenciador RNA-inducido, RISC (del inglés, RNA-induced silencing complex) (Du y Zamore, 2005; Huang *et al.*, 2010). Este complejo, que contiene miembros de la familia de proteínas Argonauta con dominio PAZ-PIWI (Murchison y Hannon, 2004), es el que lleva a cabo la represión de la expresión de genes blanco.

Los miRNAs pueden inducir la degradación del mRNA o la supresión de la síntesis de proteínas dependiendo de la complementariedad de secuencia del miRNA al transcrito blanco (Ying *et al.*, 2008). La capacidad de un miRNA para llevar a cabo la represión transcripcional de un mRNA blanco está determinada principalmente por la energía libre de la unión de los primeros 8 nt en la región 5' del miRNA, llamada región semilla (Wessner *et al.*, 2010).

Existen evidencias que indican que un mismo miRNA puede regular docenas de genes y que cada gen puede ser regulado por varios miRNAs (Wessner *et al.*, 2010), así los miRNAs juegan un papel muy importante en distintos procesos biológicos como la proliferación, el desarrollo, la diferenciación, la transducción de señales, la apoptosis y las interacciones virus-huésped (Ying *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010). Los patrones de expresión de los miRNAs pueden variar dependiendo de la etapa del desarrollo o del tipo celular (Bartel, 2004). Se ha observado que en varias enfermedades hay patrones de expresión diferenciales de miRNAs. Sin embargo, la función celular detallada de la mayoría de los miRNAs es aún desconocida (Ying *et al.*, 2008).

ANTECEDENTES

MicroRNAs e infección viral

Los virus pueden utilizar miRNAs para controlar a la célula hospedera, pero que a su vez las células del huésped utilizan miRNAs para combatir a los virus (Huang *et al.*, 2010). Evidencias experimentales muestran que los miRNAs están involucrados en la regulación de la inmunidad innata, como reguladores genéticos y como mecanismo de defensa contra virus de DNA y RNA (Huang *et al.*, 2010) y además muchos virus codifican sus propios miRNAs (Umbach y Cullen, 2009).

El primer estudio donde se mostró que los miRNAs tienen función antiviral es el que publicaron Charles H. Lecellier y sus colaboradores en el año 2005, quienes observaron que el miR-32 restringe de manera efectiva la acumulación del retrovirus PFV-1 (primate foamy virus type 1) en células humanas de riñón (293T) (Lecellier *et al.*, 2005).

También se ha observado que para controlar la replicación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), la maquinaria de silenciamiento de los miRNAs juega un papel muy importante. A su vez el VIH-1 suprime activamente la expresión del grupo policistrónico miR17/92, sugiriendo que este grupo de miRNAs afectan la replicación eficiente del virus (Triboulet *et al.*, 2007).

La sobreexpresión de miR-101 puede tener un papel importante en la represión de la replicación del virus de herpes simple (HSV-1) mediante el silenciamiento de la proteína ATP5B (Zheng *et al.*, 2011).

Recientemente se mostró que el miR-342-5p puede inhibir la biosíntesis del Coxsackievirus B (CVB) teniendo como secuencia blanco una región que codifica para la proteína 2C (Wang *et al.*, 2012).

Además, mediante herramientas computacionales se han encontrado varios miRNAs humanos que tienen como blancos potenciales genes cruciales del VIH y genes involucrados en la patogénesis y tropismo del virus de la Influenza A/H5N1 (Scaria *et al.*, 2006).

Por otro lado, el miRNA-122 se expresa específicamente en hígado, facilita la replicación del RNA del virus de la hepatitis C (Jopling *et al.*, 2005). En el 2010, Lanford y colaboradores observaron que la interacción del miR-122 con el genoma del virus de la hepatitis C (perteneciente a la familia *Flaviviridae*) es esencial para la acumulación de RNA viral en cultivos celulares hepáticos (Lanford *et al.*, 2010). Posteriormente se demostró que este miRNA promueve la replicación mediante la unión directa a dos sitios del RNA viral y, al menos en parte, estimulando la traducción mediada por IRES (sitio interno de entrada del ribosoma, por sus siglas en inglés) (Jangra *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2011).

Se ha observado que la mayoría de los herpesvirus codifican sus propios miRNAs, así como algunos adenovirus, VIH-1 y varios miembros de la familia de los poliomavirus (Zheng *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, se observó que en células hepáticas humanas Huh-7 se modulan diferencialmente 9 miRNAs durante la infección por dengue (Figura en Anexo). Varias de las probables proteínas blanco de dichos miRNAs están involucradas en la vía de apoptosis. Debido a que este proceso biológico desempeña un papel crítico en aspectos como el desarrollo, homeostasis y patogénesis (Clarke y Tyler, 2009), así como en las infecciones virales (Fischer *et al.*, 2007), el presente estudio se centra en la modulación de la apoptosis por miRNAs en células infectadas con dengue. Se seleccionó OSMR debido a que tiene mayor puntaje en las bases de datos de predicción de blancos, y que además se ha reportado que se expresa en tejido hepático (receptor de Oncostatina M, por sus siglas en inglés).

OSMR (receptor de Oncostatina M)

Las citocinas proinflamatorias son los principales mediadores intercelulares de la reacción de tejidos ante traumas e infecciones (Wang *et al.*, 2000). Se ha descrito que miembros de la familia de citocinas de interleucina 6 (IL-6) juegan un papel muy importante orquestando el inicio y la progresión de la respuesta inflamatoria y controlando procesos homeostáticos (Wang *et al.*, 2000). La Oncostatina M (OSM) es un miembro de la familia IL-6 que se une al receptor de OSM (OSMR) para actuar en diversos procesos biológicos (Chen *et al.*, 2008). Se ha descrito que tanto *in vitro* como *in vivo* esta glicoproteína funciona en procesos como regulación del crecimiento, diferenciación, expresión génica, y supervivencia celular, en muchos tipos celulares (Tanaka y Miyajima, 2003).

El receptor OSMR es una proteína de 180 kDa (kilo Daltons) específica para OSM. El dominio citoplasmático contiene sitios de unión para las tirosin cinasas Janus 1 (JAK1), JAK2, y tirosina cinasa 2 (TyK2), que transmiten señales para inducir la fosforilación de las proteínas transductor de señal y activador de la transcripción 1, 3 y 5 (STAT1, STAT3 y STAT5) (Chen *et al.*, 2008).

Se ha observado que OSM, en células dendríticas activadas (DCs, por sus siglas en inglés), se libera junto con interferón tipo I (IFN) ante la activación de TLRs (3 y 4), lo que sugiere que las dos citocinas podrían estar actuando conjuntamente en la defensa contra patógenos (Larrea *et al.*, 2009).

En un estudio llevado a cabo por Larrea y colaboradores (2009) se analizó el papel de OSM en la defensa de células de hígado contra la infección viral. Ellos observaron que en la infección viral OSMR se expresa abundantemente en células de linaje hepatocelular (Huh-7 y HepG2) pero no en las DCs, esto sugiere que la OSM producida por las DCs tiene como blanco a las células epiteliales más que las DCs mismas. También observaron que la activación por OSM reduce la carga viral en células Huh-7 infectadas con virus replicativos de la hepatitis C o A (HCV y HAV). En sinergia con IFN- α , OSM participa en la inducción y activación de STAT1,

STAT3, Jak1 así como la fosforilación de p38 MAPK, lo que podría contribuir a aumentar la expresión de genes sensibles a IFN- α en células Huh-7 infectadas con HCV o HAV.

Entre los genes inducidos por INF- α y/o OSM se muestra enriquecimiento de categorías biológicas que incluyen genes antivirales, genes involucrados en presentación antigénica, y genes que codifican factores inmunoregulatorios clave (Larrea *et al.*, 2009).

OSM y apoptosis

Se ha descrito que OSM puede tener un papel dual en la diferenciación y muerte celular. Hay estudios que muestran que puede inducir diferenciación así como inhibición del crecimiento de varios tipos celulares (Tanaka y Miyajima, 2003). Por ejemplo, se ha observado que OSM activa preferencialmente a STAT3 para inhibir el crecimiento celular en células de melanoma A375, de coriocarcinoma JAR, y de astrocitoma; y por otro lado, se ha determinado que en hepatocitos activa preferencialmente STAT5 para promover su proliferación, en células de osteosarcoma induce la sensibilización de apoptosis, y la inhibición de adipogénesis en adipocitos 3T3-L1 (Tiffen *et al.*, 2008). En líneas celulares de cáncer de mama, OSM inhibe el crecimiento celular pero también promueve la movilidad y desprendimiento celular (Tiffen *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que OSM *in vivo* y en células KIM-2 inhibe la expresión de genes de la leche (proteína ácida del suero y caseína- β), potencia la apoptosis de las células epiteliales mamarias (MECs), y promueve la expresión de metaloproteinasas (Tiffen *et al.*, 2008). Estas distintas funciones se deben, al menos en parte, a una regulación recíproca de STAT5 y STAT3 en las células epiteliales mamarias, factores de transcripción con papeles bien caracterizados en la diferenciación/supervivencia y apoptosis de MECs respectivamente (Tiffen *et al.*, 2008).

En otro estudio se observó que el OSM secretado por células Kupffer activadas interactúa de forma autócrina con su receptor para participar en la regeneración del hígado, promoviendo la proliferación de hepatocitos,

inhibiendo la apoptosis, y aumentando la formación de uniones adherentes intracelulares y la maduración de hepatocitos (Znoyko *et al.*, 2005).

Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso normal del desarrollo y la homeostasis de los organismos multicelulares (Dash, 2010). El cuerpo humano elimina aproximadamente 60×10^9 células/día mediante este proceso en respuesta a varios tipos de estrés como estímulos citotóxicos, fisiológicos o patogénicos (Wang, 2010). A diferencia de la necrosis, la apoptosis es un evento endógeno que se da de manera controlada y regulada (Dash, 2010; Wang, 2010). Las primeras características que se definieron en las células apoptóticas fueron los cambios morfológicos y la degradación del DNA cromosómico. Posteriormente se observó la aparición de moléculas de fosfatidilserina en la superficie de estas células, por un movimiento *flip-flop* de moléculas de fosfolípidos en la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Koyama *et al.*, 2000). Estos cambios suelen llevarse a cabo debido a la activación secuencial de una familia de cisteín proteasas aspartato-específicas denominadas caspasas (Clarke y Tyler, 2009).

El proceso de muerte celular se puede dividir en dos fases: la de iniciación, que depende del tipo de estímulos inductores de apoptosis; y la fase efectora, que es común a todos los procesos apoptóticos (Figura 4). Ambas involucran la acción de caspasas específicas (Koyama *et al.*, 2000).

La apoptosis por vía extrínseca es inducida por ligandos de receptores de muerte. Ante la estimulación de los receptores de muerte se recluta la proteína FADD (adaptor Fas-associated protein with death domain) y la procaspasa 8, que resulta en su autoactivación (Guicciardi y Gores, 2010). La vía intrínseca o mitocondrial, es inducida por estímulos intracelulares, como el daño a DNA, que generalmente dan como resultado la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, y la liberación de factores pro-apoptóticos (incluyendo citocromo c, SMAC/DIABLO, y AIF) desde el espacio intermembranal hacia el citosol (Guicciardi y Gores, 2010).. La liberación de citocromo c desencadena la apoptosis vía caspasa 9 y Apaf-1. La activación de la caspasa 9 y la caspasa 8 converge en la

activación de las caspasas efectoras -3, -6 y -7, resultando en inducción de apoptosis irreversible. (Jang *et al.*, 2011).

La apoptosis desempeña un papel esencial en la homeostasis, el desarrollo y la enfermedad humana debido a que facilita la eliminación de células no deseadas, dañadas o infectadas. Sin embargo, la apoptosis también puede tener un papel patogénico, contribuyendo a la muerte celular y al daño tisular (Clarke y Tyler, 2009).

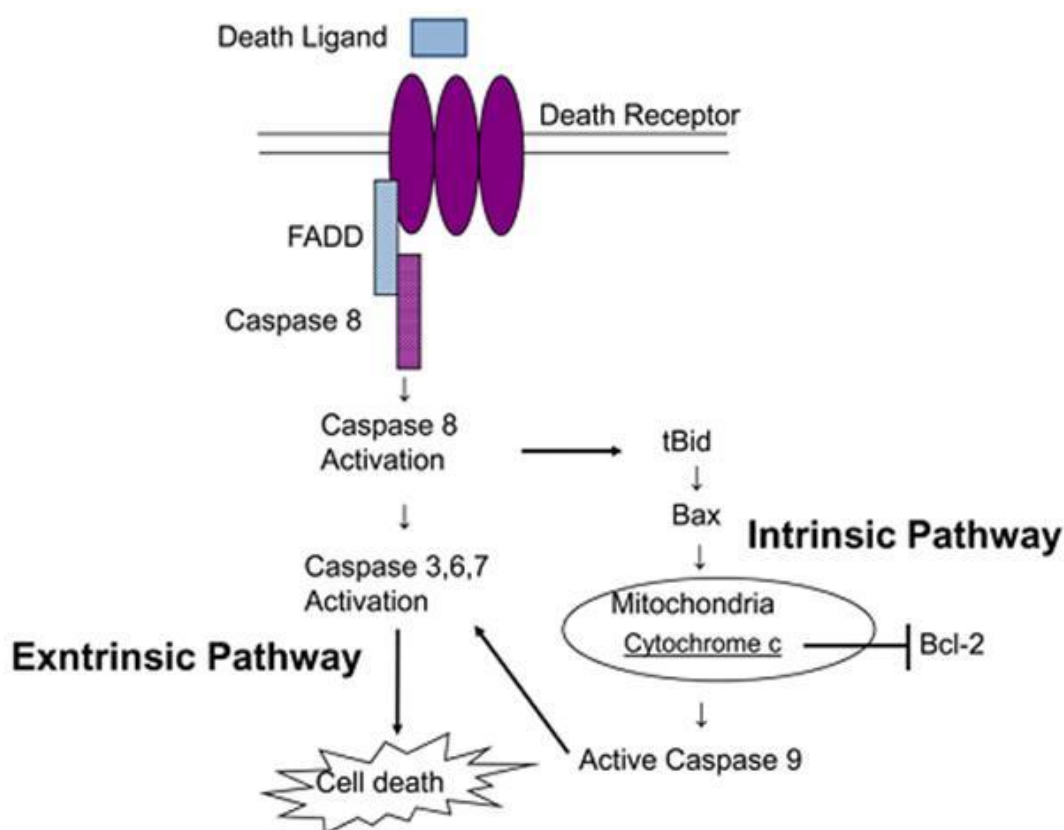


Figura 4. Vía de señalización de la apoptosis. La apoptosis por vía extrínseca es inducida por ligandos de receptores de muerte lo cual activa la caspasa 8, mientras que la apoptosis intrínseca ocurre vía el poro de transición de permeabilidad mitocondrial y activación de la caspasa 9. La activación de la caspasa 9 y la caspasa 8 converge en la activación de las caspasas efectoras -3, -6 y -7, resultando en inducción de apoptosis irreversible. (Jang *et al.*, 2011).

En las infecciones virales, la apoptosis es central para su control y eliminación (Fischer *et al.*, 2007). A su vez, algunos virus tienen la capacidad de inhibir la muerte celular apoptótica de la célula huésped o

estimularla para favorecer la diseminación viral (Hardwick, 2001; Galluzzi *et al.*, 2008).

Por ejemplo, se ha observado que en infección crónica por HCV se incrementa la apoptosis en hepatocitos pero la infección viral persiste (Fischer *et al.*, 2007). En el caso de casi todas las proteínas del HCV se han descrito efectos pro- y anti-apoptóticos, pero aún no se conoce exactamente el impacto de la apoptosis en la infección crónica por HCV (Fischer *et al.*, 2007).

En la infección por el virus dengue se ha observado que la muerte celular por apoptosis es un mecanismo citopatológico tanto *in vitro* como *in vivo* (Matsuda *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la apoptosis inducida por virus puede contribuir, al menos en parte, a la patogénesis del daño hepático inducido por DENV (Matsuda *et al.*, 2005, Smith y Khakpoor, 2009). Algunos mecanismos involucrados en la inducción de dicho proceso pueden ser los efectos citopáticos directos del virus, la disfunción mitocondrial debido a hipoxia por bajo flujo (disminución de la disponibilidad de oxígeno a nivel mitocondrial) y la influencia de factores inmunes humorales y celulares en el hígado (Seneviratne *et al.*, 2006).

Se ha observado que la infección por el virus dengue puede inducir apoptosis en las líneas celulares de hígado HepG2 y Hep3B (que tiene suprimida la vía *p53*) a los 5 días post-infección, lo que sugiere que esta inducción no es dependiente de *p53* (Thongtan *et al.*, 2004). En otro estudio se mostró que la serín proteasa NS3 codificada en el virus DENV-2 es capaz de inducir apoptosis en células Vero, 48h post-transfección (Shafee y AbuBakar, 2003). Además, en células endoteliales humanas se ha determinado que la vía de receptores de muerte (FasL/Fas) está involucrada en la muerte celular inducida por dengue (Liao *et al.*, 2010). Se sugiere que este daño podría ser la causa de la alteración de la permeabilidad vascular o las hemorragias en la forma severa de la enfermedad (Liao *et al.*, 2010).

Modulación de la apoptosis por miRNAs

Se ha establecido que los miRNAs son reguladores críticos de la apoptosis en varios tipos de células, y que por lo tanto están involucrados en enfermedades humanas asociadas a muerte celular y proliferación (Wang, 2010). Pueden actuar reprimiendo la expresión de genes proapoptóticos o antiapoptóticos para producir sus efectos. Se han validado experimentalmente más de 30 miRNAs humanos como reguladores de la apoptosis, y mediante predicciones bioinformáticas se estima que aproximadamente el 70% de los miRNAs de vertebrados tienen al menos un gen blanco relacionado a muerte celular o supervivencia (Wang, 2010). Por ejemplo, recientemente Xiong y colaboradores (2011) observaron que la sobreexpresión de miR-7 en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) suprime la proliferación celular, induce apoptosis e inhibe la migración celular *in vitro*, y reduce la tumorigénesis *in vivo*. Se sugiere que estos efectos están mediados por la represión de miR-7 sobre el gen Bcl-2 el cual pertenece a las moléculas de tipo antiapoptótico. Estos resultados proporcionan un fundamento básico para el uso de miR-7 en el tratamiento del NSCLC.

Ante la infección por el virus del Nilo Occidental (perteneciente a la familia *Flaviridae*) se ha observado que se incrementa la expresión de varios miRNAs celulares (Smith *et al.*, 2012). De éstos, el miRNA Hs_154, se ha descrito que tiene un papel importante en la apoptosis inducida por el virus al reprimir la expresión de dos transcritos asociados con la supervivencia celular, el factor de unión a CCCTC (CTCF) y la proteína co-expresada con EGFR (ECOP) (Smith *et al.*, 2012). También se ha observado, mediante ensayos de mimetismo, que el miRNA Hs_514 reduce significativamente la replicación viral, sugiriendo que la inducción de este miRNA es una respuesta antiviral celular. Se propone que el miRNA Hs_154, y tal vez otros miRNAs celulares, podrían ser factores clave en la patogénesis inducida por el virus del Nilo Occidental (Smith *et al.*, 2012).

Por todo lo anterior, nos parece muy interesante el estudio de la modulación de la apoptosis en la infección con el virus del dengue teniendo como mediadores a los miRNAs, de tal manera que se tenga conocimiento de la estrategias que utiliza la célula huésped en el control de la infección.

JUSTIFICACIÓN

Los miRNAs desempeñan un papel muy importante en diversos procesos biológicos, sin embargo la función celular detallada de la mayoría de estos es aún desconocida.

Aunque se ha observado que en la infección por dengue en diversos tipos celulares se modula la apoptosis, no se conoce el papel que pueden tener los miRNAs en este proceso.

El estudio de los efectos de la infección viral en procesos críticos como la apoptosis nos ayudará a conocer mejor las relaciones patógeno-hospedero.

OBJETIVOS

Objetivo general

➤ Determinar el efecto de la infección con dengue y la expresión de Let-7c, en la apoptosis de células hepáticas.

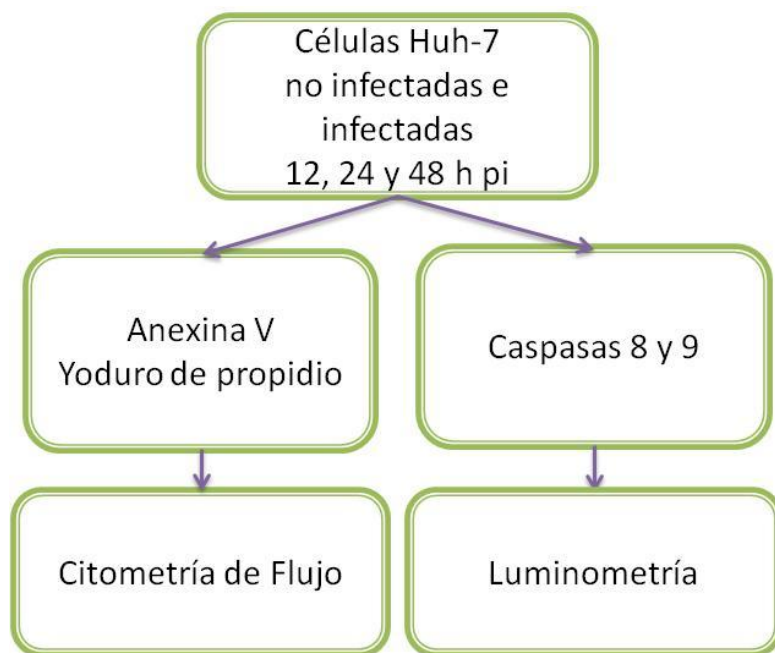
Objetivos particulares

1. Determinar los cambios en la activación de la apoptosis ante la infección con dengue de células hepáticas Huh-7.
2. Determinar el efecto del mimetizador de Let-7c en la apoptosis de células hepáticas Huh-7.
3. Evaluar los cambios en la expresión de genes blanco de Let-7c involucrados en la apoptosis tras la infección con dengue o la transfección con Let-7c.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Objetivo 1

Determinar los cambios en la activación de la apoptosis ante la infección con dengue de células hepáticas Huh-7.



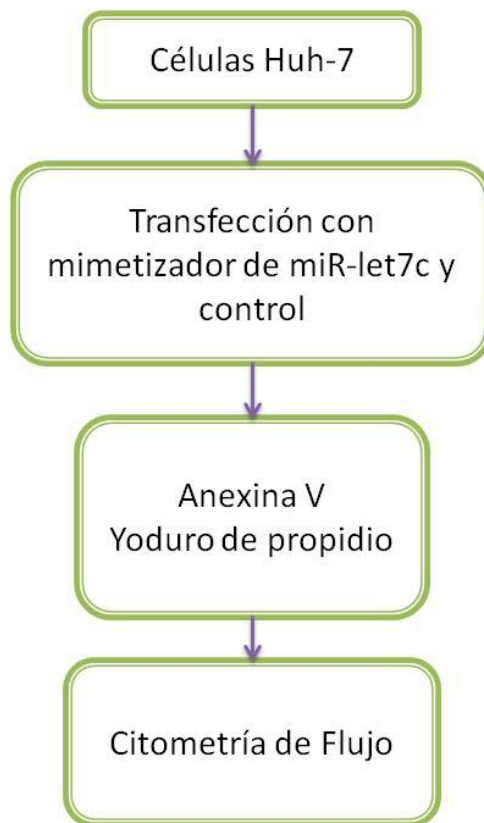
Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos y se infectaron con DENV-2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 o 5.

Para determinar los niveles de apoptosis de las células infectadas, se incubaron con los marcadores anexina V (apoptosis temprana) y yoduro de propidio (necrosis) para su evaluación mediante citometría de flujo. También se realizó la medición de la actividad de caspasas 8 (vía de apoptosis extrínseca) y 9 (vía de apoptosis intrínseca) mediante ensayos de luminometría con los kits Caspase-Glo específicos de cada una de las caspasas.

Con esta estrategia se puede analizar el efecto que tiene la infección con dengue en la apoptosis de las células hepáticas Huh-7.

Objetivo 2

Determinar el efecto del mimetizador de Let-7c en la apoptosis de células hepáticas Huh-7.



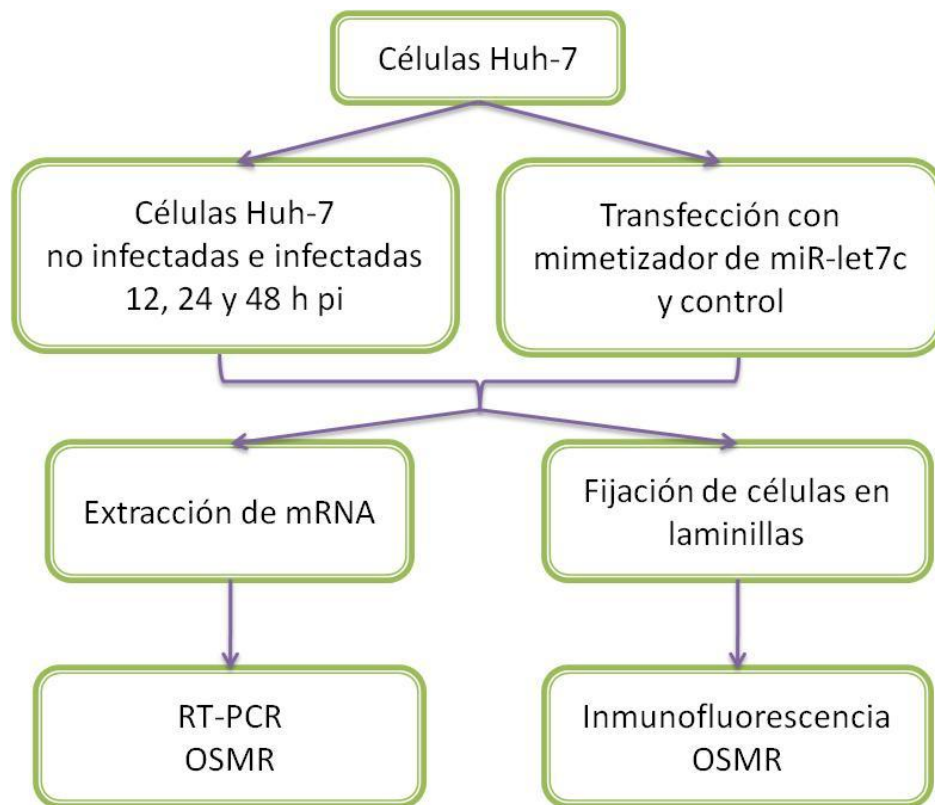
Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos y se realizó la transfección con el mimetizador de Let-7c. Como control se transfecta un mimetizador que no tenga blancos potenciales en las células de mamíferos.

Para evaluar los niveles de apoptosis de las células transfectadas, se llevaron a cabo ensayos de citometría de flujo con los marcadores anexina V y yoduro de propidio.

De esta forma podemos evaluar los efectos que tiene el mimetizador de Let-7c en la apoptosis de células hepáticas.

Objetivo 3

Evaluar los cambios en la expresión de genes blanco de Let-7c involucrados en la apoptosis tras la infección con dengue o la transfección con Let-7c.



Las células Huh-7, en placas de 24 pozos, se infectaron con DENV-2 una MOI de 3, o se transfectaron con el mimetizador de Let-7c así como con su respectivo control. Posteriormente se obtuvieron extractos de RNA y células fijadas en laminillas para analizarlas mediante RT-PCR e inmunofluorescencia respectivamente.

Dichos experimentos nos permiten caracterizar la expresión del gen analizado tras la infección con dengue o la modulación de Let-7c, tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Este estudio se llevó a cabo con la línea celular hepática Huh-7 (hepatocarcinoma humano), ya que se ha observado que el hígado es parte crítica de la patología de la infección con virus dengue (Smith y Khakpoor, 2009).

Las células se crecieron a 37°C con CO₂ al 5% en medio Advanced DMEM [(Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen, USA)] suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 7%, glutamina 10mM y antibióticos [(penicilina 5U/ml⁻¹ y estreptomicina 5 µg/ml⁻¹) Sigma].

Virus e infección

La cepa DENV-2 Nueva Guinea C se propagó en cerebros de ratones neonatos BALB/c. Las partículas virales se purificaron por centrifugación y se plaquearon en células BHK-21 para obtener el título viral.

Los ensayos de infección se realizaron incubando las células Huh-7 con el extracto del virus a una MOI de 3 ó 5 durante 2 h a 37°C y después se retiró el medio y se reemplazó con medio fresco.

Extracción de RNA

Las células Huh-7 sembradas en placa de 24 pozos se lavaron con PBS [137 mM NaCl, 4.6 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.47 KH₂PO₄, (pH 7.0)] y se incubaron con Trizol (Invitrogen, USA) por 5 min, se homogenizaron con micropipeta y se agregó el 20% de volumen de cloroformo; se mezcló y se centrifugó a 12,000 g [gravedades, indicador de RCF (fuerza centrífuga relativa)] por 15 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se agregó isopropanol en una relación de volumen 1:1; se dejó incubando toda la noche a -20°C. Posteriormente se realizó una centrifugación a 12,000 g

(RCF) por 10 min a 4°C, se lavó la pastilla celular con etanol al 70% y se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en agua libre de RNasa y se almacenó a -80°C hasta su uso.

La integridad de los RNAs se verificó corriendo una alícuota de 1 µl del extracto en gel de agarosa. La cuantificación del RNA se determinó por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo scientific).

PCR y qRT - PCR tiempo real

Se tomaron 300-600 ng de extracto de RNA y se trataron con DNAsa (New England Biolabs) incubando a 37°C por 15 min, luego se agregó 1 µl de EDTA (25mM) por 5 min a 70°C para inactivar la DNAsa. Posteriormente el RNA tratado se sometió a una reacción de retrotranscripción adicionando al extracto 0.5 mM de oligo dT (Applied Biosystems), e incubando a 70°C por 5 min, luego se agregó una mezcla de amortiguador de reacción, 2.4 µl de MgCl₂ 25 mM, 10 mM de cada dNTP, 1 µl de enzima RT Improm-II (concentración no revelada por el proveedor) (Promega) y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 µl. La mezcla anterior se incubó 5 min a 25°C, 60 min a 42 °C y 15 min a 70°C.

Una vez obtenido el cDNA se utilizaron 2 µl (~1,500 ng) para preparar la reacción de PCR a la que se agregaron 12.5 µl de KAPA2G Fast HotStart ready mix 2X (Kappa Biosystems) y los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos completando a un volumen final de 25 µl con agua de ampolleta. La mezcla se trató a 95°C por 1 min, 40 ciclos de 95°C por 10 s, a la temperatura de fusión óptima (T_m, 60°C para todos los oligos) del par de oligonucleótidos por 10 s y 72°C por 1 s; y finalmente un ciclo de 72°C por 30 s. En el caso de las reacciones de PCR en tiempo real se agregaron 1.25 µl de Eva Green 20x (Biotium) a la mezcla y el termociclador se programó de la siguiente manera: un ciclo de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, T_m del par de oligonucleótidos por 30 s y 72°C por 30 s; y una etapa final de disociación de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min.

La cuantificación de expresión relativa del mRNA se determinó mediante el análisis de los resultados por el método $\Delta\Delta C_t$, utilizando el gen de la GAPDH como gen constitutivo de referencia.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Gen	Secuencia	Amplicón
DENV (NS5)	Fw 5'TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA3' Rv 5'GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC3'	266 pb
OSMR	Fw 5'GCAAGTCAAGGAAATGTCAGTG3' Rv 5'CCCCAAGGCAGTGTCCGTCC3'	150 pb
SUPT7L	Fw 5'CTGAACGTCAGGCGACCTCAGG3' Rv 5'TGCCCGAAAGGAGCACGAAGAAC3'	128 pb
GAPDH	Fw 5'GGAAGGTGAAGGTCTGGAGTC3' Rv 5'GAAGATGGTGATGGGATTTC3'	227 pb

Transfección de mimetizador del hsa-miR-Let7-c

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos y cuando alcanzaron una confluencia del 80% ($\sim 1.4 \times 10^5$ células por pozo) se transfectaron mediante lipotransfección con los mimetizadores del hsa-miR-Let7-c y control (Applied Biosystems). Se utilizó una mezcla del reactivo siPORT Amine (Ambion) y 50 nM de los mimetizadores. Esta mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y luego se agregó a la monocapa de células.

Inmunofluorescencia

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos que contenían cubreobjetos de 13 mm de diámetro. Después de los distintos tiempos post-tratamiento (12, 24 o 48 h), se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 min. Se permeabilizaron con acetona fría por 2 min, se

realizó un lavado con PBS y se bloquearon con SFB al 10% por 2 horas a TA. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-OSMR (Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron 5 lavados de 5 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a TA en ausencia de luz. Se realizaron 5 lavados adicionales con PBS y finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI-vectashield (Vector Laboratories). Las laminillas se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2) con el objetivo 63x.

Citometría de Flujo

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos y a los distintos tiempos post-tratamiento se despegaron con tripsina y se resuspendieron en medio Advanced DMEM (Invitrogen, USA). Luego se transfirieron a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 min. La pastilla celular se lavó con buffer de unión a anexina V frío [Hepes-NaOH pH 7.4 10mM, NaCl 150 mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM y CaCl₂ 1.8 mM (Brumatti *et al.*, 2008)] y se centrifugó una vez más bajo las mismas condiciones resuspendiendo en 100 µl de buffer de unión a anexina V. A continuación se incubaron con 2.5 µl de FITC Annexin V (50 µg/250 µl) (Santa Cruz Biotechnology) y 5 µl de yoduro de propidio (1 mg/ml) por 15 min a TA en ausencia de luz. Finalmente se agregaron 200 µl de buffer de unión a anexina V y se analizaron en un Citómetro de Flujo (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS, de Becton Dickinson Immunocytometry Systems). La adquisición de datos se realizó por medio del programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson).

Actividad de Caspasas

Las células Huh-7 se sembraron en placas blancas de 96 pozos y después de los distintos tiempos post-tratamiento se dejaron atemperar a TA por 10 min. Se agregaron directamente a cada pozo 75 µl del reactivo

Caspase-Glo específico para caspasa 8 o 9 (Promega) y se agitaron a 300 rpm por 30 s. Se incubaron 35 min a TA en ausencia de luz y después se realizó la medición de luminiscencia en un luminómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific).

El ensayo con el reactivo Caspase-Glo utiliza un sustrato luminogénico (tetrapéptido) de la caspasa específica y luciferasa estable. En ausencia de caspasas activas, el sustrato de caspasa no actúa como sustrato de luciferasa, y por lo tanto no se produce luz, por el contrario, cuando hay caspasas activas presentes, los sustratos respectivos se procesan y se libera aminoluciferina que contribuye a la generación de luz en una reacción luminiscente (Figura 5) (Niles *et al.*, 2004).

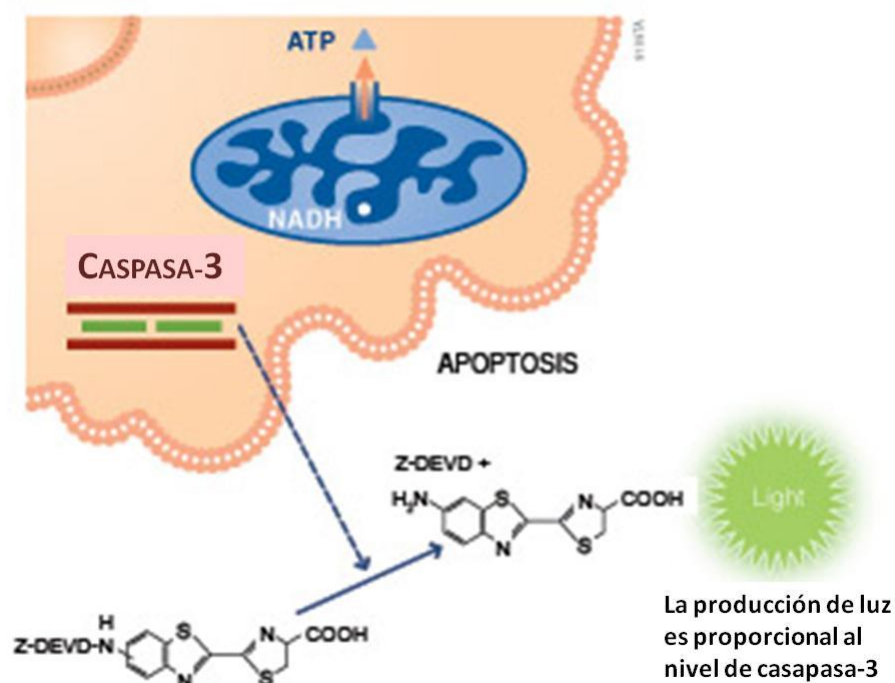


Figura 5. Evaluación de la actividad de caspasas mediante el reactivo Caspase-Glo. En presencia de caspasas activas, el sustrato luminogénico respectivo es cortado y se libera aminoluciferina que contribuye a la generación de luz en una reacción luminiscente. La señal luminiscente resultante es directamente proporcional a la cantidad de actividad de caspasas presente en la muestra

(<http://worldwide.promega.com/products/pm/caspase-glo/overview/>).

Como control positivo de inducción de apoptosis se incluyó un tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración 1,600 μM (Quiao *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Apoptosis en infección con virus dengue

Para comparar el nivel de apoptosis de células Huh-7 no infectadas e infectadas con DENV-2 se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo a dos multiplicidades de infección diferentes (MOI de 3 o 5).

El porcentaje de apoptosis de 5,000 eventos contados de cada muestra se presenta en la Figura 6.

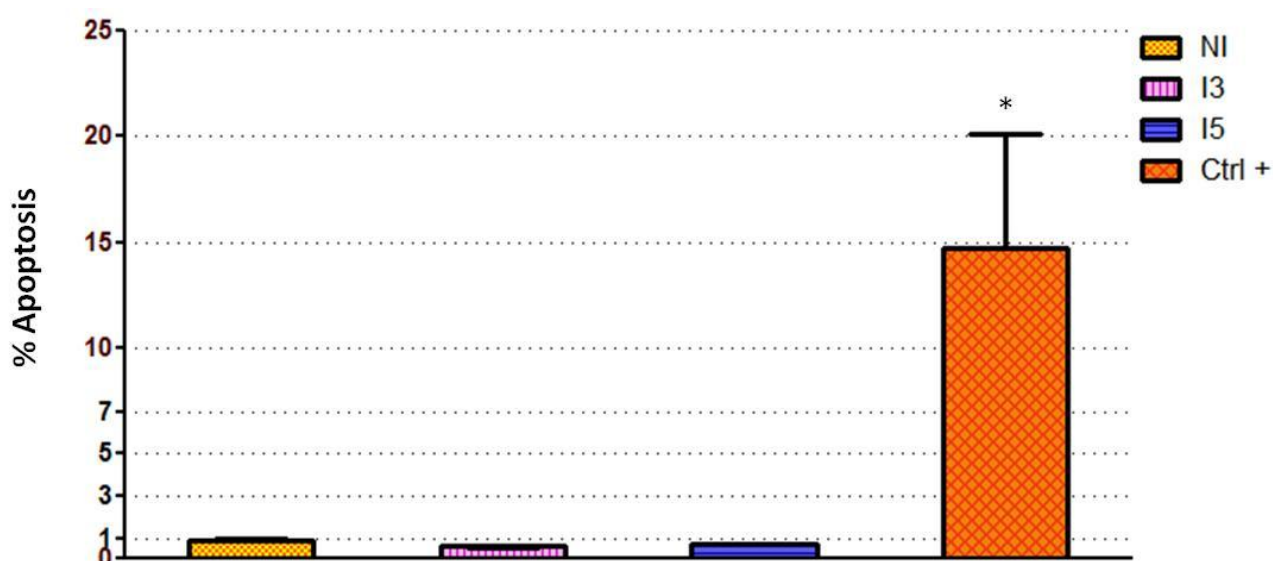


Figura 6. Detección de anexina V en células Huh-7 infectadas. Las células Huh-7 se infectaron o no (NI) con DENV-2 a una MOI de 3 (I3) o 5 (I5), además se incluyó un control positivo de apoptosis con 800 μ M de peróxido de hidrógeno (Ctrl +), 48 h postinfección se trataron para la tinción con el anticuerpo anexina V conjugado a FITC y posteriormente se determinó el nivel de dicho marcador de apoptosis mediante citometría de flujo. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres experimentos calculada con el programa GraphPad Prism, Análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el programa GraphPad Prism (* $P < 0.05$).

Los resultados obtenidos indican que en las células de la línea Huh-7 analizadas en el presente trabajo no hay diferencias significativas en el nivel de apoptosis entre las células no infectadas y las infectadas, ni entre

las células infectadas a las dos multiplicidades de infección del experimento. Esto es diferente a lo reportado en otros tipos celulares en los que se ha determinado que a las 48 h postinfección existe un aumento de la apoptosis de las células infectadas (Shafee y AbuBakar, 2003; Liao *et al.*, 2010).

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de actividad de caspasas 8 y 9 para determinar el nivel de apoptosis por distintas vías (intrínseca y extrínseca) de las células Huh-7 no infectadas e infectadas con DENV-2 a una MOI de 3 (debido a que no se encontraron diferencias entre la MOI de 3 y 5 en el experimento anterior). Los resultados de los ensayos luminométricos se muestran en las Figuras 7 y 8.

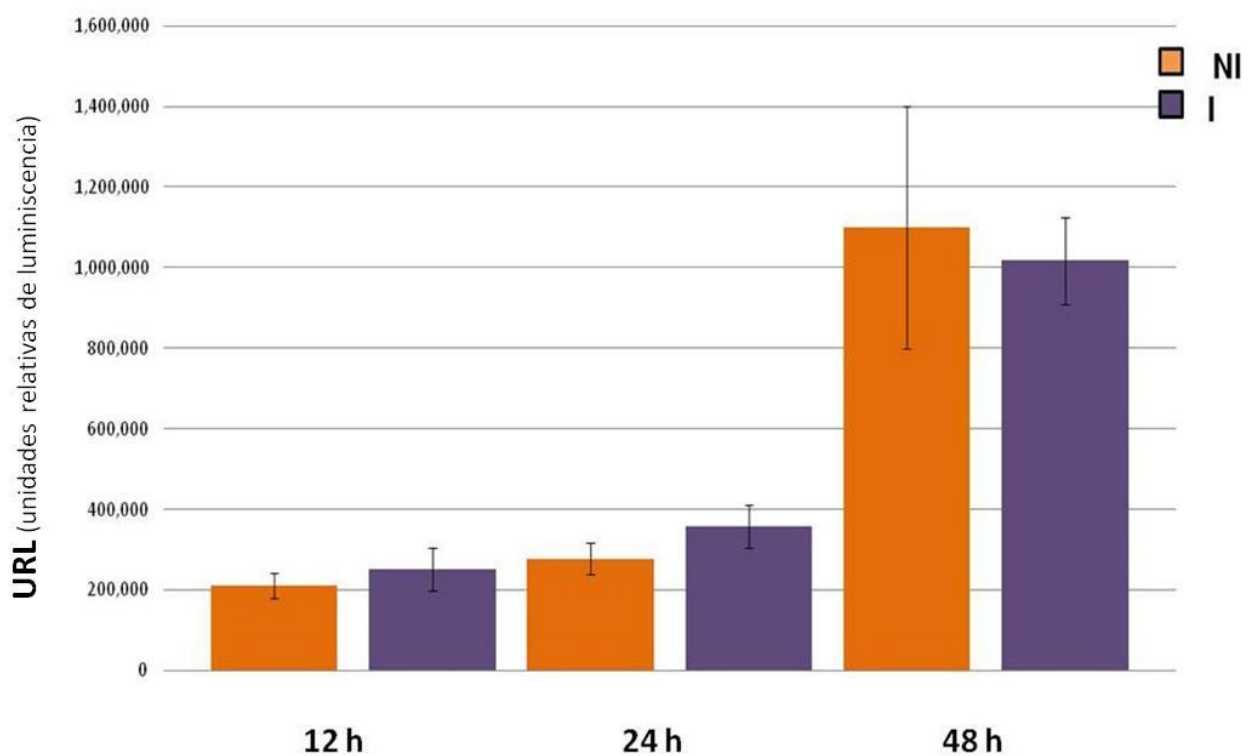


Figura 7. Detección de la actividad de Caspasa 8 en células Huh-7 infectadas.

Las células Huh-7 no infectadas (NI) o infectadas (I) con DENV-2 (MOI de 3) se cosecharon a 12, 24 y 48 h postinfección y se incubaron con el sustrato luminogénico de caspasa 8 (Z-LETD-aminoluciferina). Posteriormente se determinó el nivel de actividad de dicho marcador mediante luminometría. El eje Y corresponde a las unidades relativas de luminiscencia (URL) en la cual se graficó el promedio de dos experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar calculada por el programa GraphPad Prism.

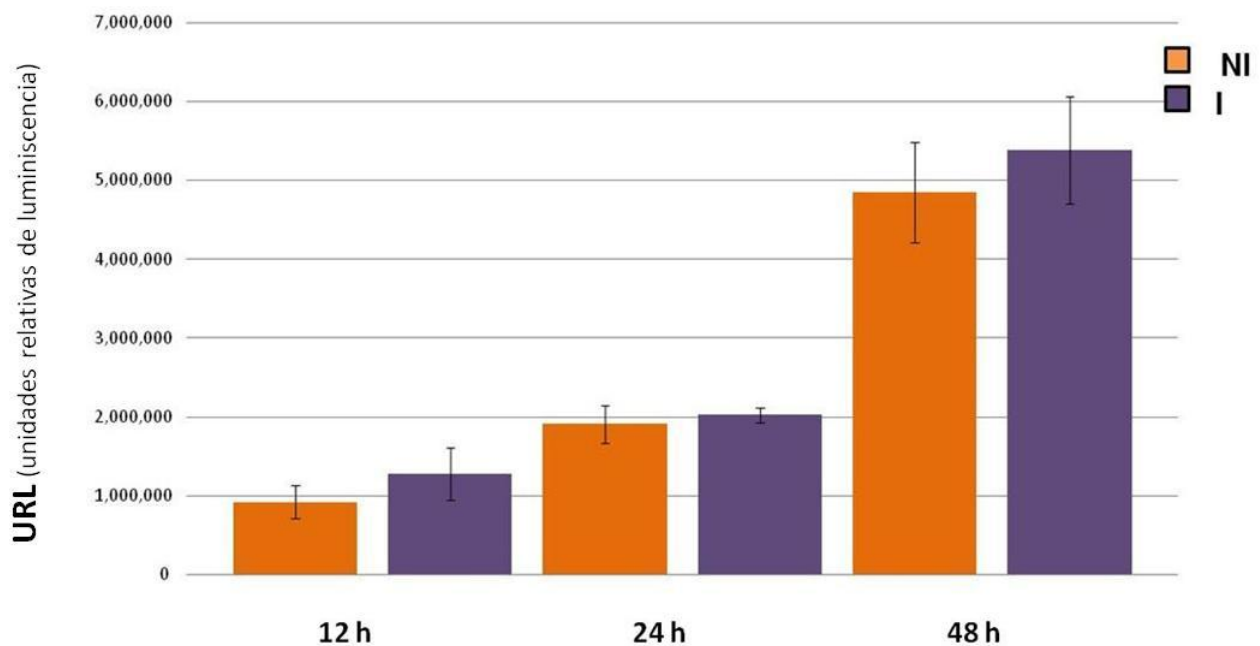


Figura 8. Detección de la actividad de Caspasa 9 en células Huh-7 infectadas.

Las células Huh-7 no infectadas (NI) o infectadas (I) con DENV-2 (MOI de3) se cosecharon a 12, 24 y 48 h postinfección y se incubaron con el sustrato luminogénico de caspasa 9 (Z-LEHD-aminoluciferina). Posteriormente se determinó el nivel de actividad de dicho marcador mediante luminometría. El eje Y corresponde a las unidades relativas de luminiscencia (URL) en la cual se graficó el promedio de dos experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar calculada por el programa GraphPad Prism.

Los resultados obtenidos muestran que tanto para la vía extrínseca (caspasa 8) como para la vía intrínseca y/o extrínseca (caspasa 9) de apoptosis no se detectan cambios en la actividad de caspasas entre las células no infectadas e infectadas. Esto indica que entre las dos condiciones no hay diferencias en la activación de apoptosis en etapas tempranas.

Los resultados de los distintos experimentos realizados para la detección de apoptosis en las células Huh-7 muestran que no hay diferencias entre las células no infectadas e infectadas con virus DENV-2.

Efecto de Let-7c en la apoptosis de células hepáticas Huh-7

Para conocer si el miRNA Let-7c induce apoptosis en células hepáticas, se realizó el análisis de citometría de flujo en células transfectadas con el mimetizador de dicho miRNA.

Los resultados no muestran diferencias significativas en el porcentaje de células en apoptosis cuando se transfecta el precursor de Let-7c comparado con el precursor control (Figura 9). Cabe mencionar que los resultados de la Figura 9 fueron obtenidos utilizando los mimetizadores a una concentración de 50 nM, en la cual se ha determinado que existe un aumento de al menos 350 veces la expresión de Let-7c (Escalera, 2011).

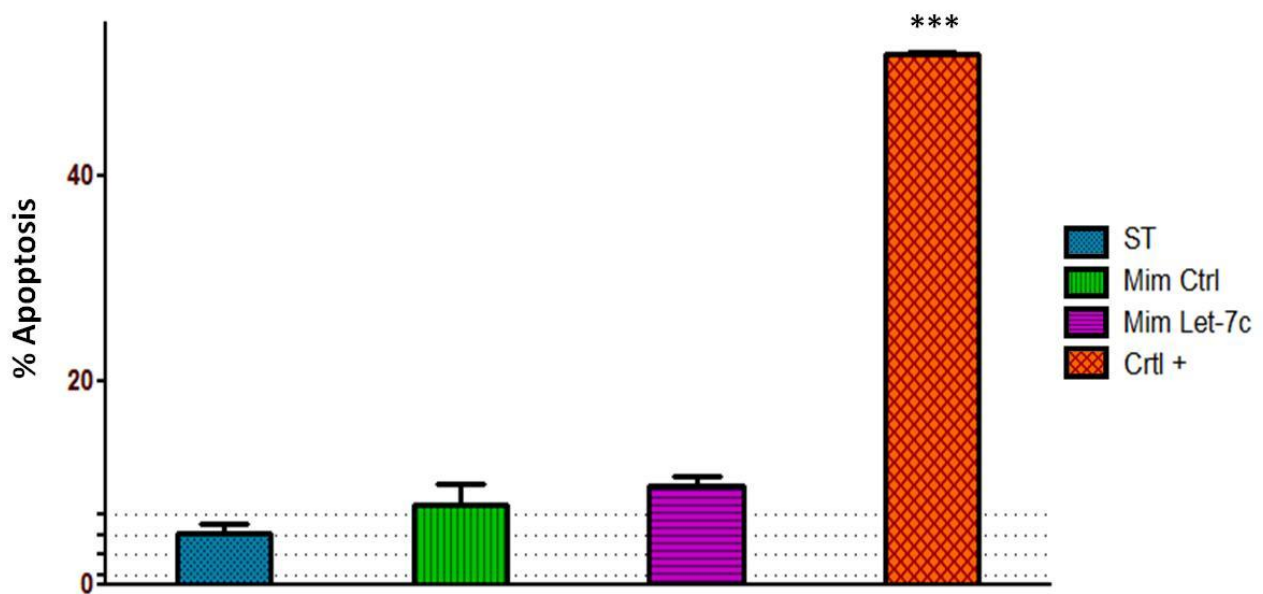


Figura 9. Detección de anexina V en células Huh-7 transfectadas con el mimetizador Let-7c.

Las células Huh-7 se transfectaron con 50nM del mimetizador de Let-7c (Mim Let-7c) o el mimetizador control (Mim Ctrl) así como un control positivo de apoptosis con 1,600 μ M de peróxido de hidrógeno (Ctrl +) y una muestra sin tratar (ST), 48 h post-transfección se trataron para la tinción con el anticuerpo anexina V conjugada a FITC y posteriormente se determinó el nivel de dicho marcador de apoptosis mediante citometría de flujo. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres experimentos calculada con el programa GraphPad Prism. Análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el programa GraphPad Prism (***) $P < 0.001$.

*** $p < 0.001$.

Los resultados anteriores sugieren que Let-7c no tiene un efecto por sí mismo en la apoptosis de células hepáticas. En un estudio realizado por Shimizu y colaboradores (2010), se observó que la sobreexpresión de Let-7c induce apoptosis en sinergia con el fármaco anti-cáncer sorafenib en líneas celulares y tejidos hepáticos. Por otro lado, se ha sugerido que en células endoteliales, Let-7c, contribuye a la apoptosis inducida por ox-LDL mediante la supresión de Bcl-xL (Qin *et al*, 2012).

OSMR es un probable blanco de Let-7c

Con la finalidad de investigar cuáles mRNAs podrían ser blancos de Let-7c se llevó a cabo la predicción *in silico* mediante los programas TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) y MicroCosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>), y de entre dichos mensajeros se determinó cuáles participan en la regulación de la apoptosis

El programa TargetScan se caracteriza por la predicción de blancos biológicos de miRNAs buscando la presencia de sitios 8-mer (nucleótidos) y 7-mer conservados que coincidan con la región semilla de cada miRNA. Éste considera coincidencias en sitios en UTRs, y los blancos se predicen utilizando el algoritmo TargetScan.

El programa MicroCosm contiene blancos predichos computacionalmente para microRNAs en muchas especies. Las secuencias de miRNAs se obtienen del Registro miRBase y la mayoría de secuencias genómicas de Ensembl. MicroCosm utiliza el algoritmo miRanda para identificar posibles sitios de unión para un miRNA dado en secuencias genómicas. Este algoritmo selecciona los blancos basándose en tres propiedades (Zhang y Verbeek, 2010):

1. Complementariedad de secuencia usando un algoritmo de alineamiento local ponderado.

2. Energía libre de dúplex RNA-RNA usando las rutinas de plegamiento de RNA Viena con el fin de estimar su estabilidad termodinámica.
3. Conservación de blancos en genomas relacionados.

En los primeros 20 blancos probables de Let-7c resultantes con cada programa, encontramos cuatro genes que se relacionan con apoptosis (pudiendo tener un papel positivo o negativo) y que además se conoce su expresión en hígado. Nos enfocamos en SUPT7L y OSMR debido a que las proteínas que codifican, además de sugerirse que están involucradas en la apoptosis, son las que más se expresan en células hepáticas (Nakamura *et al.* 2004; Chipoy *et al.*, 2007; Gamper y Roeder, 2008). En la Tabla 1 se muestran las características de los sitios de interacción predichos para Let-7c con los dos mRNAs.

mRNA Blanco	Longitud 3'UTR (nt)	miRNAs	Efecto en apoptosis	Expresión en hígado
SUPT7L (suppressor of Ty 7 [<i>S. cerevisiae</i>]-like))	421	1 sitio Let-7c	Activa p53	+
OSMR (oncostatin M receptor)	2,197	1 sitio Let-7c	Podría ser + ó -	+

Tabla. 1. Características principales de los sitios de interacción de miR-Let-7c con los mRNAs mensajeros blanco estudiados.

Primeramente se determinó si en las condiciones de nuestros experimentos se expresaban los mRNAs mencionados en la línea celular Huh-7, para lo cual se diseñaron iniciadores que amplificarían el mRNA de cada una de las dos moléculas y se observó que los oligonucleótidos sintetizados para OSMR funcionaban mejor y presentaban un mejor nivel de amplificación en dichas células que los diseñados para SUPT7L (Figura 10). Consideramos que la menor eficiencia de amplificación que

observamos con SUPT7L podría deberse, al menos en parte, a que esta línea celular expresa de forma basal niveles menores de este mRNA. También se debe considerar que los oligonucleótidos diseñados para amplificar SUPT7L podrían no ser los óptimos.

Posteriormente para determinar si la proteína OSMR se detectaba en las células Huh-7, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y su posterior observación por microscopía confocal utilizando diferentes protocolos de tinción. De esta forma se estableció que la mejor condición para la detección de dicha proteína fue fijando las células con paraformaldehído, permeabilizando con acetona y utilizando el anticuerpo anti-OSMR (Santa Cruz, Biotechnology). Como se observa en la Figura 11, la proteína OSMR tiene una localización principalmente citoplasmática, esto concuerda con los resultados de estudios previos donde se ha observado que la mayoría de estos receptores se localizan intracelularmente, aunque también se pueden observar en la superficie (regulados por Jak1, Jak2 y Tyk2) (Radtke, 2002), en la membrana celular (cuando aumenta OSM) y juxtannuclearmente (Chen. 2008).

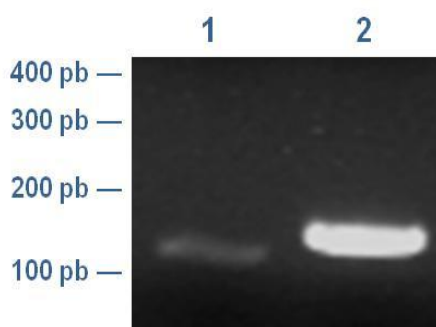


Figura 10. RT-PCR de los mRNAs de SUPT7L y OSMR de células Huh-7. El RNA total extraído a partir de células Huh-7 se utilizó para la amplificación mediante RT-PCR en punto final del mRNA correspondiente a SUPT7L con un tamaño de 128 pb (carril 1) y OSMR (carril 2) con un tamaño de 150 pb. Los amplicones obtenidos se separaron en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

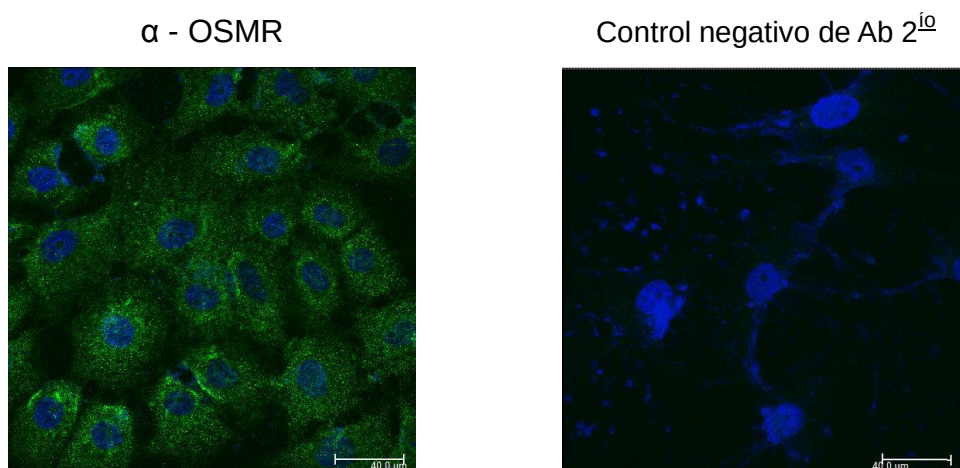


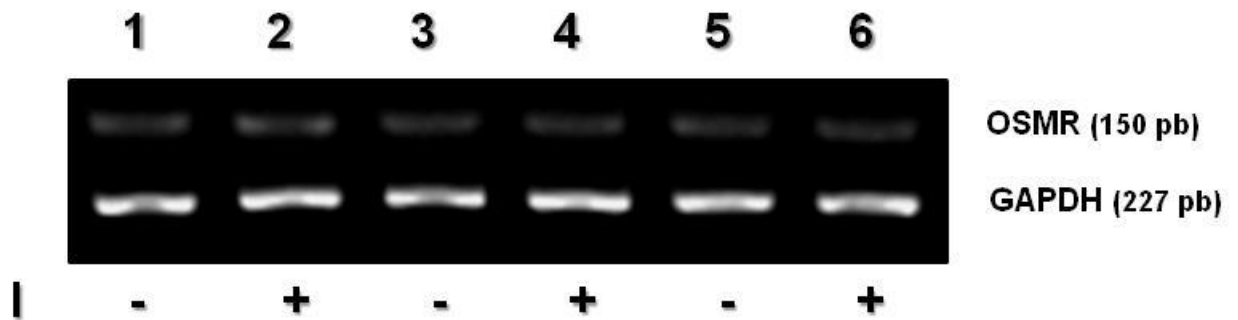
Figura 11. Detección de OSMR por inmunofluorescencia en células Huh-7.

Las células Huh-7 se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con el anticuerpo de conejo anti-OSMR y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 anti-conejo (verde). El núcleo de las células se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes. Tamaño de la barra, 40 μ m.

Después de la caracterización inicial de SUPT7L y OSMR en células Huh-7, la investigación se enfocó en OSMR debido a que se pudo detectar tanto al mRNA como a la proteína mediante los protocolos probados.

Primeramente se utilizaron extractos de RNA total de células infectadas con dengue para determinar mediante RT-PCR en punto final (Figura 12a) y en tiempo real (Figura 12b) las diferencias en la expresión de OSMR a las 12, 24 y 48 h postinfección. Los resultados muestran que no fue posible detectar diferencias significativas en la expresión de dicho mensajero en los tiempos analizados. Sin embargo, se pudo observar que la tendencia de la media siempre fue al incremento en células infectadas.

a)



b)

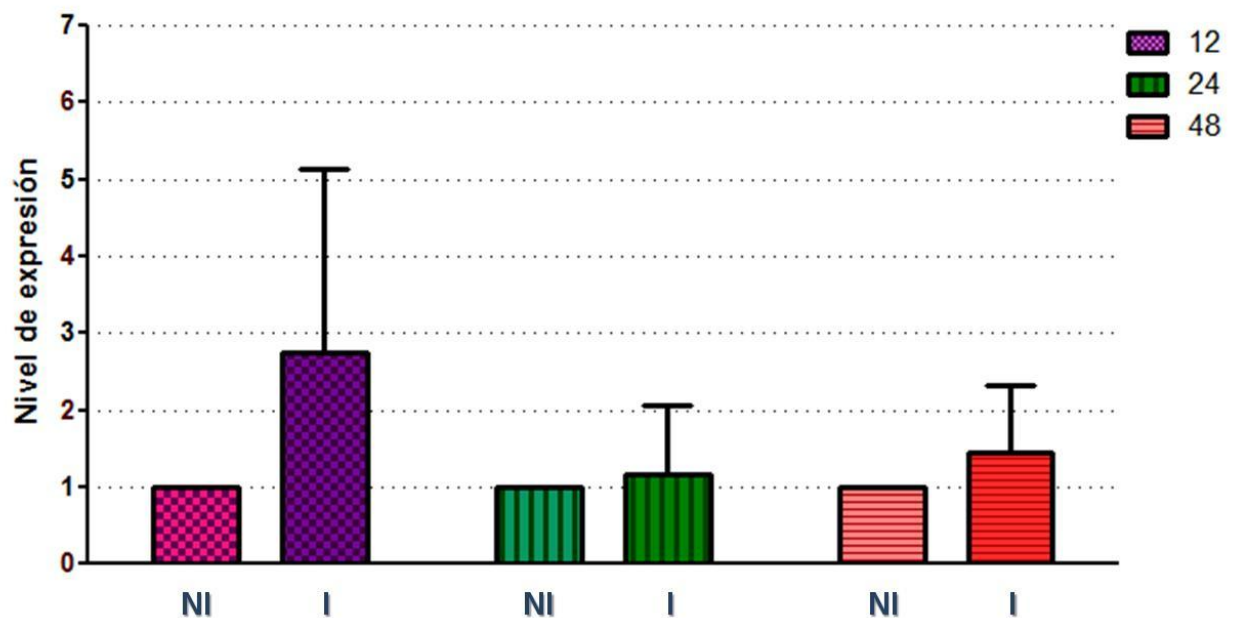


Figura 12. Expresión del gen OSMR en células Huh-7 infectadas. Las células Huh-7 se infectaron (I) o no (NI) con DENV-2 a una MOI de 3 y a las 12, 24 y 48 h postinfección se extrajo el RNA total y se determinó el nivel de expresión de OSMR mediante **(a)** RT-PCR en punto final y **(b)** qRT-PCR. Las imágenes mostradas en a) son representativas de los tres experimentos independientes. Las barras mostradas en b) corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes calculada con el programa GraphPad Prism.

Por otro lado, se determinó la expresión de OSMR a nivel de proteína debido a que los miRNAs pueden actuar tanto a nivel de degradación de los mRNAs específicos y/o de la inhibición de la traducción, lo cual sólo podría observarse mediante la detección de la proteína. En este caso se llevó a cabo la detección por inmunofluorescencia y como se puede observar en la Figura 13, el nivel de expresión de dicha proteína se ve disminuido en las células infectadas, principalmente a las 12 h postinfección, independientemente de que no existe una disminución en la cantidad de mRNA.

Cabe mencionar que la infección de las células se verificó mediante la amplificación de un fragmento del genoma viral correspondiente a la proteína NS5 (Figura 14).

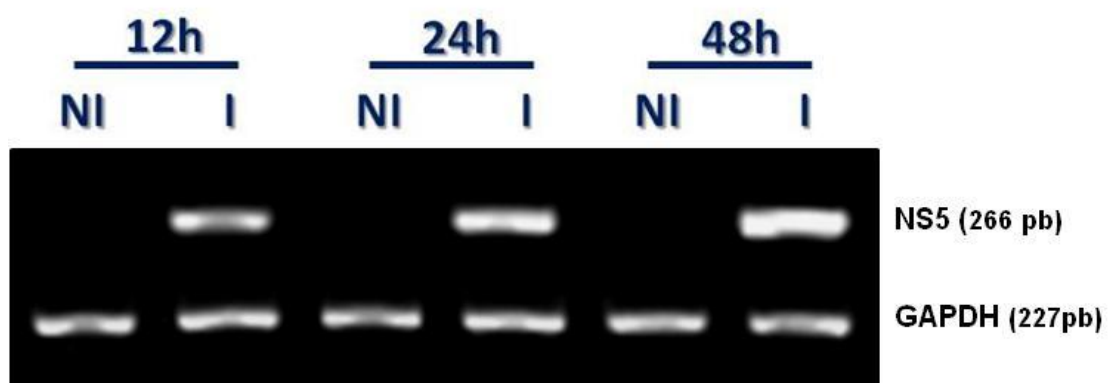


Figura 14. Expresión de NS5 del DENV en células Huh-7 infectadas. Las células Huh-7 se infectaron (I) o no (NI) con DENV-2 a una MOI de 3 y a las 12, 24 y 48 h postinfección se extrajo el RNA total y se analizó la expresión del fragmento del genoma viral correspondiente a la proteína NS5 mediante RT-PCR en punto final.

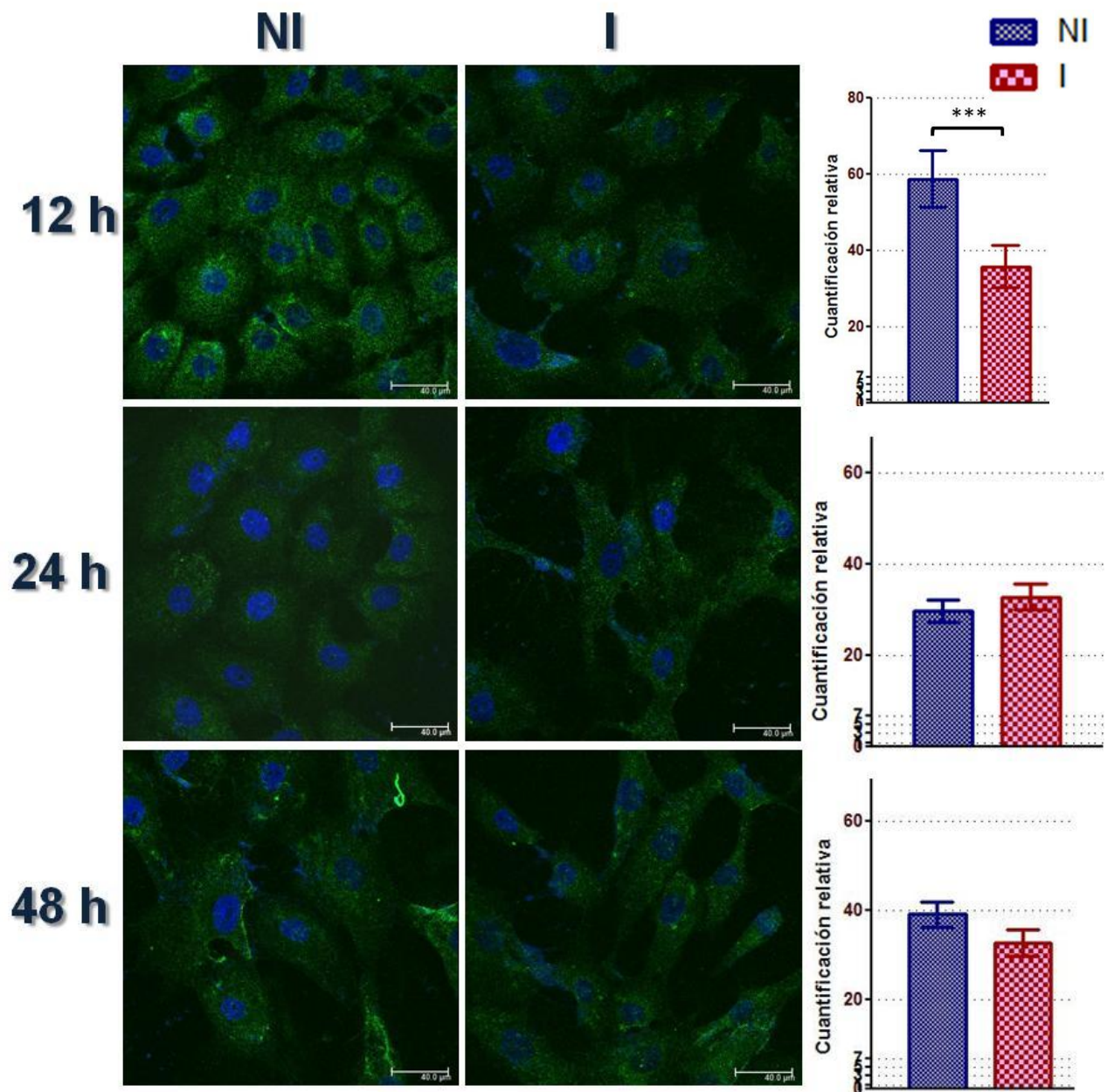


Figura 13. Inmunofluorescencia de OSMR en células Huh-7 infectadas. Las células Huh-7 no infectadas (NI) o infectadas (I) con DENV-2 a una MOI de 3, a las 12, 24 y 48 h postinfección se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con el anticuerpo de conejo anti-OSMR y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 anti-conejo (verde). El núcleo de las células se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes. Las gráficas muestran la cuantificación relativa de fluorescencia de OSMR de cada condición en los diferentes tiempos analizados (LAS AF Lite, 2.2.1). Tamaño de la barra, 40 μm . Análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el programa GraphPad Prism (***) $P < 0.001$.

*** $p < 0.001$.

Con base en los resultados descritos anteriormente, se sugiere que la expresión de la proteína OSMR se regula en la infección, al menos en parte, en respuesta al aumento de Let-7c en las células infectadas por dengue. Por ello, se decidió llevar a cabo la transfección del mimetizador de Let-7c y determinar el nivel de expresión de OSMR tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína.

Los resultados del análisis de RT-PCR en tiempo real de la expresión del gen OSMR en las células tratadas con el mimetizador de Let-7c y el mimetizador control se muestran en la Figura 15. Como se puede observar en la figura no hay diferencias significativas en el nivel de expresión del mRNA de OSMR en la condición de transfección.



Figura 15. Expresión del gen OSMR en células transfectadas con el mimetizador de Let-7c. Las células Huh-7 se transfectaron con 50 nM del mimetizador de Let-7c (Mim Let-7c) y del mimetizador control (Mim Ctrl). 24 h post-transfección se extrajo el RNA y se determinó el nivel de expresión de OSMR mediante qRT-PCR el cual se normalizó utilizando los valores de expresión del gen de expresión constitutiva GAPDH. En el eje Y se graficó el nivel de expresión calculado mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes calculada con el programa GraphPad Prism.

Adicionalmente se determinó el nivel expresión de la proteína OSMR en presencia del mimetizador de Let-7c, y se observó que hay una ligera disminución pero no significativa al transfectar el mimetizador del miRNA Let-7c comparado con el mimetizador control (Figura 16).

Estos resultados sugieren que Let7c puede modular de manera negativa a OSMR a nivel de proteína aunque no a nivel de mRNA. Cabe recordar que los miRNAs pueden actuar de cualquiera de estos dos niveles al unirse a su mRNA blanco.

Como se describió anteriormente, el análisis de la expresión de OSMR ante la infección con virus dengue tampoco mostró diferencias significativas a nivel de mRNA, sin embargo el nivel de expresión de la proteína sí se ve disminuido significativamente en las células infectadas a las 12 h.

Lo anterior sugiere que el miRNA Let-7c afecta a OSMR mediante la inhibición de la traducción, así mismo se puede postular que la disminución de la proteína OSMR ante la infección con virus dengue podría deberse a la acción del miRNA Let-7c que aumenta en condiciones de infección.

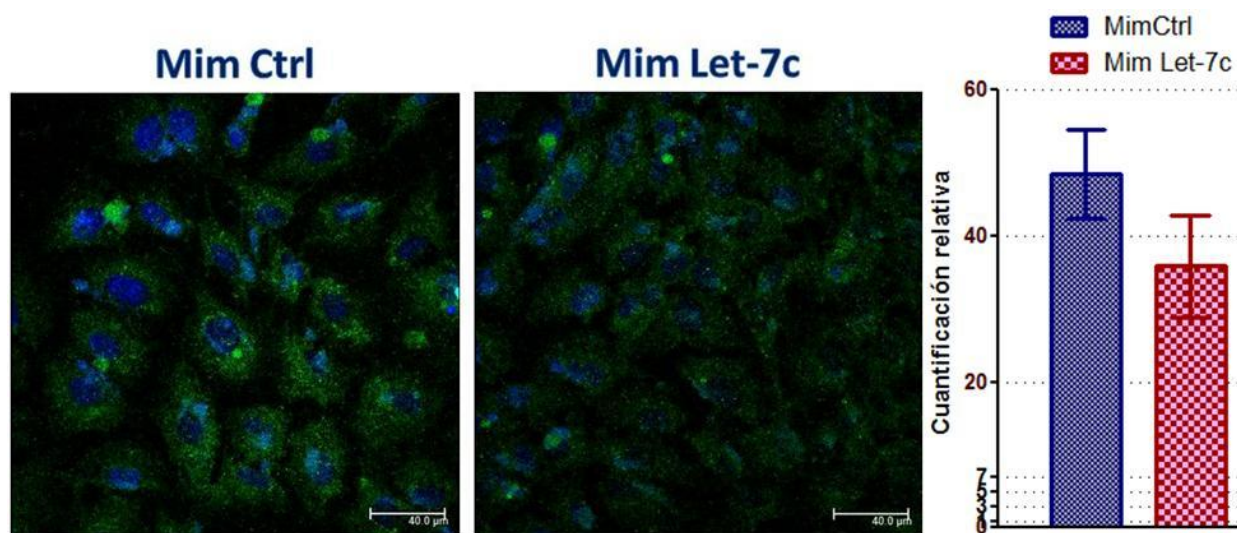


Figura 16. Inmunofluorescencia de OSMR en células transfectadas con el mimetizador de Let-7c. Las células Huh-7 se transfectaron con 50nM del mimetizador de Let-7c (Mim Let-7c) o del mimetizador control (Mim Ctrl) y a las 24 h post-transfección se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con el anticuerpo de conejo anti-OSMR y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 anti-conejo (verde). El núcleo de las células se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes. Las gráficas muestran la cuantificación relativa de fluorescencia de OSMR (Leica Application Suite, Advanced Fluorescence Lite, 2.2.1) de cada condición. Tamaño de la barra, 40 μ m.

DISCUSIÓN

Se han identificado varios miRNAs que muestran alteraciones en su expresión tras la infección con virus dengue (Escalera, 2011). Uno de estos miRNAs, Let7c, se induce fuertemente tras la infección con este virus.

Let-7c pertenece a la familia conservada Let-7 que codifica 13 miRNAs homólogos localizados en regiones genómicas frecuentemente alteradas o suprimidas en cánceres humanos (Johnson *et al.*, 2007; Nadiminty *et al.*, 2012). Se ha mostrado que miembros de Let-7 regulan los niveles de expresión de oncogenes como HMGA2, RAS y Myc, así como genes involucrados en regulación del ciclo celular, división celular (Nadiminty *et al.*, 2012), diferenciación, embriogénesis (Park *et al.*, 2007), proliferación y apoptosis (Qin *et al.*, 2012). En particular, Let-7c se considera que funciona como supresor de tumor, al observarse que inhibe el crecimiento de tumores de próstata tanto *in vitro* como *in vivo*, y que los niveles de este miRNA son bajos en muestras clínicas de cáncer de próstata (Nadiminty *et al.*, 2012). Estas observaciones sugieren que la reconstitución de dicho miRNA podría tener efectos benéficos en cáncer reduciendo la proliferación y supervivencia de células tumorales (Nadiminty *et al.*, 2012), así como en otras enfermedades tales como la arterioesclerosis (Qin *et al.*, 2012).

Debido a que el miRNA Let-7c es el que tiene un mayor aumento ante la infección por virus dengue en células Huh-7 (Escalera, 2011), y que es considerado como probable factor pro-apoptótico o supresor de tumor (Nadiminty *et al.*, 2012), quisimos investigar si al infectar dicha línea celular o al aumentar la expresión de Let-7c se inducía la muerte celular por apoptosis.

Primeramente, se determinó que las células Huh-7, analizadas en el presente trabajo, no mostraron diferencias en el nivel de apoptosis cuando se compararon las células no infectadas con las infectadas usando DENV-2 a una MOI de 3 o 5. Esto difiere con lo observado en otros tipos celulares en los que se ha determinado que a 48 h postinfección existe un aumento en la apoptosis de las células infectadas (Marinneau *et al.*, 1997; Shafee y

AbuBakar, 2003; Matsuda *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2010).

Analizando por separado los niveles de apoptosis ante la infección con dengue por la vía extrínseca (caspasa 8) o por la vía intrínseca (caspasa 9) tampoco se detectaron diferencias entre las células no infectadas e infectadas desde las 12 hasta 48 horas postinfección.

En estudios con otras líneas celulares se han observado diferencias en los niveles de apoptosis entre las células no infectadas e infectadas con condiciones de tiempo y multiplicidad de infección similares a las utilizadas en el presente estudio (Desprès *et al.*, 1996; Matsuda *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2010). Después de revisar dichos reportes podemos observar que la diferencia con estos resultados podría deberse, en parte, a las características intrínsecas de las líneas celulares, pues se ha reportado que varios factores como la línea celular o el tipo de tejido examinado pueden afectar la detección de los eventos apoptóticos (Sundquist *et al.*, 2006). En estudios de muestras de hígado infectadas con virus dengue, al analizar y comparar la presencia de antígenos virales o de genoma viral, se ha observado que los resultados son discordantes, proponiendo que esto puede reflejar diferencias metodológicas o diferencias inherentes al tropismo tisular del virus utilizado (Smith *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que algunos eventos apoptóticos pueden ser subestimados porque la línea celular o el tejido de interés no expresa la proteína necesaria para su detección (Sundquist *et al.*, 2006). Por ejemplo, la línea celular de cáncer de mama MCF-7 carece de un producto del gen caspasa 3 funcional, así que la apoptosis puede ser subestimada por ensayos que utilizan sustratos DEVD (Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)) para detectar la actividad de caspasas 3/7 (Sundquist *et al.*, 2006). En este trabajo se trató de descartar este fenómeno al analizar los niveles de inducción de apoptosis por distintos métodos que indican la activación por distintas vías mediante la utilización de sustratos de caspasa 8, sustratos de caspasa 9, y la detección de fosfatidilserina expuesta en la superficie celular.

Además, al incluir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como control positivo de inducción de apoptosis, se comprobó que esta línea celular no es refractaria a la inducción de muerte celular programada. Por ello sugerimos que en las células Huh-7 infectadas pueden existir mecanismos que estén inhibiendo la apoptosis. Se ha reportado que la infección por virus dengue induce muerte celular apoptótica y que está implicada como mecanismo citopatológico (Catteau *et al.*, 2003; Shafee *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2010), pero se sugiere que no es un efecto generalizado a todos los tipos celulares. En un estudio realizado por Mc Lean y colaboradores (2011) se observó que DENV-2 y el virus Modoc (flavivirus murino) inducen apoptosis en macrófagos pero no en células MDCK (epiteliales de riñón), 293T (fibroblastos de riñón humano), HeLa (carcinoma humano) y Vero (fibroblastos de riñón de mono verde), ni en fibroblastos primarios embrionarios de ratón Swiss Webster. Estos resultados, obtenidos a altas multiplicidades de infección (desde MOI 10 hasta 1,190) y tiempos post-infección tardíos (desde 24 hasta 288 horas), lo cual sugiere que dichos virus pueden activar señales pro-supervivencia (Mc Lean *et al.*, 2011). En particular, en el estudio mencionado, se identificó a la proteína no estructural NS4A de DENV-2 y Modoc como un mediador viral del aumento de autofagia y protección contra la muerte celular, en un mecanismo dependiente de PI3K el cual es importante para la replicación del flavivirus en células epiteliales renales (McLean *et al.*, 2011). Con ello se ha propuesto relacionar la infección persistente de flavivirus en hepatocitos y células epiteliales con el hecho de que no sufren muerte celular (McLean *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que el aumento de apoptosis ante la infección con dengue no es dependiente de *p53* dado que la muerte celular se induce tanto en líneas celulares que expresan *p53* como en las que tienen esta vía suprimida, HepG2 y Hep3B respectivamente (Thongtan *et al.*, 2004). Sin embargo dicha inducción es marcadamente diferente entre éstas, siendo de hasta el 90% de células en apoptosis en las Hep3B comparada con solamente el 20% de las células HepG2 al día 5 postinfección (Thongtan *et al.*, 2004). En este mismo estudio se observó que al día 7 postinfección

todas las células Hep3B habían muerto y que la progenie viral fue nueve veces mayor que la de la línea celular que tiene *p53* normal (HepG2), la cual sobrevivió hasta 3 meses. Estos resultados sugieren que, mientras la inducción de apoptosis en células hepáticas es mediada por una vía no regulada por *p53*, dicha proteína podría jugar un papel en restringir el nivel de progenie viral por debajo del nivel crítico en el que la apoptosis es activada (Thongtan *et al.*, 2004).

La línea celular Huh-7 tiene el gen *p53* mutado y se ha observado que expresa niveles altos de proteína comparada con otras líneas celulares hepáticas (Bressac *et al.*, 1990; Hsieh *et al.*, 2003). Se sugiere que estos niveles elevados de la proteína *p53* se deben al aumento en su estabilidad al tener una vida media prolongada. Esto puede ser resultado de la unión de la *p53* mutada con una proteína de 70 kDa de la familia de las de choque térmico (Bressac *et al.*, 1990). En el presente estudio se pueden asociar los niveles elevados de *p53* en la línea celular Huh-7 con el papel propuesto de que este gen es importante para la restricción del nivel de progenie viral por debajo del nivel crítico en el que se activa la apoptosis.

Se ha mostrado que en respuesta a la acumulación de proteínas virales en el Retículo Endoplásmico (RE) ante la infección por virus dengue, se induce estrés del RE y éste contribuye a la muerte celular apoptótica (Desprès *et al.*, 1996). Se sugiere que en este proceso está implicada la activación de NF- κ B (Marinneau *et al.*, 1997). Resulta interesante que al exponer a las células Huh-7 a estrés oxidativo con H₂O₂ se produce un incremento en la muerte celular programada, pero al activar constitutivamente NF- κ B se inhibe la apoptosis (Qiao *et al.*, 2006). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Matsuda y colaboradores (2005), se observó que la inducción de apoptosis ante la infección con virus dengue de células HepG2, requiere la actividad transcripcional de NF- κ B que controla la inducción de la expresión de Apo2L/TRAIL.

Se propone que el efecto de NF- κ B como protector o promotor de muerte celular depende de la naturaleza de los estímulos, tipo celular, genes blanco y en qué medida éstos son activados o inhibidos, y si otras

vías de señalización son coactivadas por otros factores de transcripción (Qiao *et al.*, 2005).

NF- κ B también regula a FasL que contiene en su promotor elementos de respuesta a este factor de transcripción (Matsuda *et al.*, 2005). En la inducción de apoptosis ante la infección con DENV-2, en células HepG2 no se induce la expresión de FasL (Matsuda *et al.*, 2005), sin embargo, en células endoteliales vasculares sí se incrementa la expresión de FasL por lo que se propone que la vía FasL/Fas está involucrada en la apoptosis inducida por la infección en este tipo celular (Liao *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que Apo2L/TRAIL y FasL activan receptores de muerte celular participando de esta manera en la vía extrínseca de apoptosis (Matsuda *et al.*, 2005). Por lo anterior, sería interesante analizar la modulación de NF- κ B y sus genes blanco en la línea celular Huh-7 y su relación con la no activación de la apoptosis ante la infección con virus dengue.

Un estudio reciente llevado a cabo por Li y colaboradores (2012) sugiere que la proteína CAML (modulador de calcio y ligando de ciclofilina, por sus siglas en inglés) modula el proceso de apoptosis y favorece la producción viral en células Huh-7 infectadas con DENV-2 (MOI de 0.1). En dicho estudio se observó que al silenciar CAML en las células infectadas se induce la activación de apoptosis, y por el contrario, cuando se aumenta la expresión de CAML los niveles de apoptosis disminuyen. Así, el aumento de CAML (que interactúa con la proteína C de DENV) a partir de las 6 h post-infección se ha relacionado con la inhibición de apoptosis detectada a partir de las 36 h post-infección. Por otro lado, se sugiere que al regular CAML los niveles intracelulares de calcio, los virus pueden usar esta propiedad para elevar los niveles de calcio citosólico y proteger así a las células del daño a la mitocondria y de la apoptosis; por lo tanto, se crea un microambiente adecuado para la producción y replicación eficiente del virus dengue (Li *et al.*, 2012). Estos resultados son consistentes con los del presente trabajo en cuanto a que no hay una activación de la vía de apoptosis en células Huh-7 ante la infección por virus dengue, sin embargo,

el trabajo de Li y colaboradores (2012) se realizó con una MOI de 0.1, que comparada con los demás trabajos de apoptosis e infección con DENV es muy baja (Shafee *et al.*, 1996; Marinneau *et al.*, 1997; Thongtan *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2010; Nagila *et al.*, 2013).

El análisis comparativo de los efectos de la infección por virus dengue en distintos tipos celulares ayuda a comprender las vías de señalización involucradas en la inducción de la expresión genética y su relación con la apoptosis, así como conocer los mecanismos por los que los virus inducen muerte celular y enfermedad (Matsuda, 2005).

Después de determinar el efecto que tiene la infección en la línea celular Huh-7 se realizaron los ensayos de transfección del mimetizador de Let-7c con la finalidad de obtener un aumento de Let-7c utilizando como control la transfección de un mimetizador que no tiene blanco predicho entre los mRNAs de humano. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas en los niveles de apoptosis de las células Huh-7 transfectadas con el mimetizador de Let-7c comparadas con el mimetizador control, sugiriendo que el miRNA Let-7c no tiene un efecto directo en el porcentaje de células apoptóticas en esta línea celular.

En una investigación realizada por Shimizu y colaboradores (2010), se demostró que la sobreexpresión de Let-7c regula negativamente la expresión de Bcl-xL en líneas celulares y tejidos hepáticos, e induce apoptosis en sinergia con un fármaco anti-cáncer (sorafenib) que tiene como blanco la proteína anti-apoptótica de la familia de Bcl-2, Mcl-1. En otro estudio se observó que Let-7c contribuye a la apoptosis de células endoteliales inducida por ox-LDL (lipoproteína de baja densidad oxidizada) mediante la supresión de Bcl-xL (Qin *et al.*, 2012). En conjunto estos resultados sugieren que el miRNA Let-7c puede sensibilizar a las células a sufrir apoptosis, pero por sí mismo no provoca un aumento en los niveles de muerte celular programada.

En el presente estudio también se analizó de dos maneras el efecto de Let-7c sobre su probable blanco OSMR, primero en células infectadas con DENV-2 (en donde se da un aumento de Let-7c) y posteriormente en células transfectadas con el mimetizador de Let-7c.

El receptor de OSM se ha descrito que funciona en diversos procesos biológicos como en la regulación del crecimiento, diferenciación, expresión génica, y supervivencia celular, en muchos tipos celulares (Tanaka y Miyajima, 2003).

Se sugiere que OSM podría estar actuando como citocina junto con IFN- α en la defensa contra patógenos (Larrea *et al.*, 2009). En el estudio realizado por Larrea y colaboradores (2009) se observó que OSM reduce la carga viral en células Huh-7 infectadas con HCV o de la hepatitis A en sinergia con IFN- α . Dichos autores mostraron que OSM participa en la inducción de STAT1, STAT3 y Jak1; así como en la activación de p38 MAPK, lo que podría contribuir a aumentar la expresión de genes sensibles a IFN- α en las células infectadas. Entre los genes inducidos por IFN- α y OSM observaron enriquecimiento de categorías biológicas que incluyen genes antivirales, genes involucrados en presentación antigénica, y genes que codifican factores inmunoreguladores clave. Se sugiere que este efecto podría ser relevante para la limpieza mediante el sistema inmune de las células infectadas con virus (Larrea *et al.*, 2009).

OSM está implicado en múltiples funciones a veces divergentes en varios tipos celulares (Fossey *et al.*, 2011). Puede activar preferencialmente a STAT3 para inhibir el crecimiento en células de melanoma, coriocarcinoma, astrocitoma y células epiteliales mamarias, potenciando la apoptosis (Tiffen *et al.*, 2008); también se ha mostrado que OSM puede promover la sensibilización de apoptosis en osteosarcoma (Chipoy *et al.*, 2007) y la inhibición de adipogénesis en células 3T3-L1 en ambos casos mediante la activación de STAT5 (Miyaoka *et al.*, 2006).

Por otro lado, en células Kupffer activadas participa en la regeneración del hígado promoviendo la proliferación de hepatocitos, inhibiendo la apoptosis, y aumentando la formación de uniones adherentes y la maduración de hepatocitos (Znoyko *et al.*, 2005); y también está

involucrado en el remodelamiento de hueso en parte mediante la estimulación de la diferenciación y activación de osteoblastos (Fossey *et al.*, 2011).

Debido a que OSMR tiene una alta expresión en células de linaje hepatocelular y que está implicado en la defensa de células de hígado contra infecciones virales (Larrea *et al.*, 2009) así como en la apoptosis, en el presente estudio analizamos en primer lugar la modulación de este receptor ante la infección con virus dengue.

Los resultados muestran que OSMR a nivel de mRNA no sufre cambios significativos en su expresión ante la infección con virus dengue, sin embargo, a nivel de proteína detectamos que el nivel de expresión disminuye en las células infectadas. Esto sugiere que OSMR es modulado mediante inhibición de la traducción cuando las células son infectadas con virus dengue.

Al ser OSMR un blanco predicho de Let-7c, y con los antecedentes de que Let-7c aumenta su expresión ante la infección por dengue (Escalera, 2011), analizamos los niveles de OSMR cuando se sobreexpresa Let-7c utilizando el sistema de transfección de mimetizadores para dicho miRNA. El aumento en la expresión de Let-7c en las células Huh-7, no se indujeron cambios en el nivel de mRNA de OSMR pero sí hay una ligera disminución a nivel de proteína. Esto indica que el miRNA Let-7c puede modular de manera negativa a OSMR a nivel de proteína aunque no tiene efecto sobre el nivel de expresión de mRNA. A este respecto, se ha mostrado que los miRNAs pueden actuar a nivel de degradación de los mRNAs específicos y/o de la inhibición de la traducción (Fabian *et al.*, 2010), por lo tanto, con base en los resultados descritos anteriormente, sugerimos que el miRNA Let-7c tiene efecto sobre OSMR mediante la inhibición de la traducción.

Los resultados del análisis de la modulación de OSMR cuando se aumenta la expresión de Let-7c correlacionan con los obtenidos ante la infección con virus dengue al no observarse diferencias a nivel de mRNA pero sí a nivel de la proteína. Por ello sugerimos que la disminución de la proteína OSMR ante la infección con virus dengue podría deberse, al

menos en parte, a la acción del miRNA Let-7c que aumenta en condiciones de infección.

Para determinar si OSMR es efectivamente un blanco directo de Let-7c serán necesarios experimentos adicionales como, por ejemplo, la clonación de la 3'UTR del mRNA de OSMR en un vector reportero que permita monitorear la expresión del gen en condiciones de transfección de Let-7c.

También sería interesante analizar en esta línea celular los efectos que pueda tener por sí solo el aumento o la inhibición de la expresión de OSMR en la infección por virus dengue.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizaron los niveles de muerte celular programada en la línea celular Huh-7 ante la infección con virus dengue serotipo 2 y no se observó modulación ante la infección.

Se evaluaron los niveles de apoptosis a distintos tiempos post-infección y mediante diferentes metodologías para caracterizar los efectos de la infección por virus dengue de una manera más amplia.

Después del análisis de resultados se podría sugerir que en las células Huh-7 existen mecanismos celulares y/o virales que están inhibiendo el aumento de la apoptosis en las células infectadas.

Los niveles elevados de *p53* en la línea celular Huh-7 se podrían asociar con el papel propuesto para este gen en la restricción de la cantidad de progenie viral por debajo del nivel crítico en el que se activa la apoptosis.

Los niveles de apoptosis ante el aumento exógeno de la expresión del miRNA Let-7c (tratando de reproducir lo que ocurre en infección) se analizaron para investigar si se producen cambios. Al no observar diferencias entre las distintas condiciones, sugerimos que este miRNA no tiene un efecto directo en el porcentaje de células apoptóticas o hay otro mecanismo que bloquea la apoptosis.

El efecto del miRNA Let-7c sobre su probable blanco predicho OSMR sugiere fuertemente que OSMR es modulado por este miRNA mediante inhibición de la traducción. Los resultados también sugieren que ante la infección con el virus dengue, la expresión de la proteína OSMR es modulada mediante inhibición de la traducción.

La disminución de la proteína OSMR ante la infección con virus dengue podría deberse, al menos en parte, a la acción del miRNA Let-7c que aumenta en condiciones de infección.

En el presente trabajo se proporciona el análisis de los niveles de apoptosis ante la infección con virus dengue 2 mediante varias metodologías y en distintos tiempos post-infección, así como la relación del aumento del miRNA Let-7c en infección con la modulación de OSMR. Con

ello se aportan datos que contribuyen al estudio de la relación patógeno hospedero desde un enfoque molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambros, V. R. 2008. En K. Appasani (ed.), **MicroRNAs: from basic science to disease biology**. Cambridge University Press, New York.
- Bartel, D. P. 2004. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function**. Cell. 23;116(2):281-97.
- Beasley D. W. C., y A. D. T. Barret. 2008. **The infectious agent**. En S. B. Halstead (ed.), Tropical Medicine: Science and Practice Vol. 5 DENGUE. Imperial College Press. International Vaccine Institute, Korea.
- Beauvais, P., B. Quinet, J. M. Richardet. 1993. **Dengue. Apropos of 2 cases**. Arch Fr Pediatr. 50(10):905-7. Source Service de Pédiatrie, Hôpital Trousseau, Paris.
- Berezikov, E., W. J. Chung, J. Willis, E. Cuppen, y E. C. Lai. 2007. **Mammalian mirtron genes**. Mol Cell. 26;28(2):328-36.
- Bressac, B., K. M. Galvin, T. J. Liang, K. J. Isselbacher, J. R. Wands, y M. Ozturk.1990. **Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma**. Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A. March; 87(5): 1973–77.
- Brumatti, G., C. Sheridan, S. J. Martin. 2008. **Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells**. Methods. Mar;44(3):235-40.
- Catteau, A., O. Kalinina, M. C. Wagner, V. Deubel, M. P. Courageot, y P. Desprès. 2003. **Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM**. Journal of General Virology. Oct;84, 2781–93.
- Chen, D., C. Y. Chu, C. Y. Chen, H. C. Yang, Y. Y. Chiang, T. Y. Lin, I. P. Chiang, D. Y. Chuang, C. C. Yu, y K. C. Chow. 2008. **Expression of**

- short-form oncostatin M receptor as a decoy receptor in lung adenocarcinomas.** *Journal of Pathology*. Jul;215(3):290-9.
- Chipoy, C., B. Brounais, V. Trichet, S. Battaglia, M. Berreur, L. Oliver, P. Juin, F. Rédini, D. Heymann, y F. Blanchard. 2007. **Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53.** *Oncogene*. Oct 11;26(46):6653-64.
- Clarke, P., y K. L. Tyler. 2009. **Apoptosis in animal models of virus-induced disease.** *Nat Rev Microbiol*. 7(2): 144–155.
- Clyde, K., J. L. Kyle, y E. Harris. 2006. **Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.** *Journal of Virology*. Dec;80(23):11418-31.
- Dalrymple, N., y E. R. Mackow. 2011. **Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors.** *Journal of Virology*. Sep;85(18):9478-85.
- Dash, P. 2010. **Apoptosis.** En www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash. Basic Medical Sciences, St.George's, University of London.
- Desprès, P., M. Flamand, P. E. Ceccaldi, y V. Deubel. 1996. **Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells.** *Journal Of Virology*, June; 70(6) 4090–96.
- Du, T., y P. D. Zamore. 2005. **microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.** *Development*. 132(21):4645-52.
- Escalera, M. 2011. Tesis doctoral en proceso. Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D. F.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg, y W. Filipowicz. 2010. **Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs.** *Annual Review of Biochemistry*. 79:351-79.
- Fernández-García, M. D., L. Meertens, M. Bonazzi, P. Cossart, F. Arenzana-Seisdedos, y A. Amara 2011. **Appraising the roles of**

- CBLL1 and the ubiquitin/proteasome system for flavivirus entry and replication.** Journal of Virology. Mar;85(6):2980-9.
- Fink, J., F. Gu, L. Ling, T. Tolfvenstam, F. Olfat, K. C. Chin, P. Aw, J. George, V. A. Kuznetsov, M. Schreiber, S. G. Vasudevan, M. L. Hibberd. 2007. **Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients.** PLoS Neglected Tropical Diseases. November; 1(2): e86.
- Fischer, R., T. Baumert, y H. E Blum. 2007. **Hepatitis C virus infection and apoptosis.** World J Gastroenterol 28; 13(36): 4865-72.
- Fischl, W., y R. Bartenschlager. 2011. **Exploitation of cellular pathways by Dengue virus.** Current Opinion in Microbiology. Aug;14(4):470-5.
- Fossey, S. L., M. D. Bear, W. C. Kisseberth, M. Pennell, y C. A. London. 2011. **Oncostatin M promotes STAT3 activation, VEGF production, and invasion in osteosarcoma cell lines.** BMC Cancer. Apr 11;11:125.
- Galluzzi, L., C. Brenner, E. Morselli, Z. Touat, y G. Kroemer. 2008. **Viral control of mitochondrial apoptosis.** PLoS Pathog. 30;4(5).
- Gamper, A. M., y R. G. Roeder. 2008. **Multivalent binding of p53 to the STAGA complex mediates coactivator recruitment after UV damage.** Molecular and Cellular Biology. Apr;28(8):2517-27.
- Gubler, D. J. 2002. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.** Trends Microbiol. 10(2):100-3.
- Guicciardi, M. E., y G. J. Gores. 2010. **Apoptosis as a mechanism for liver disease progression.** Seminars in Liver Disease. Nov;30(4):402-10.
- Halstead, S. B. 2008. **Dengue: overview and history.** En S. B. Halstead (ed.), Tropical Medicine: Science and Practice Vol. 5 DENGUE. Imperial College Press. International Vaccine Institute, Korea.
- Hardwick, J. M. 2001. **Apoptosis in viral pathogenesis.** Cell Death Differ. 8(2):109-10.

- Hsieh, J. L., C. L. Wu, C. H. Lee, y A. L. Shiau. 2003. **Hepatitis B virus X protein sensitizes hepatocellular carcinoma cells to cytolysis induced by E1B-deleted adenovirus through the disruption of p53 function.** Clinical Cancer Research. Jan;9(1):338-45.
- Huang, Y.,X. J. Shen, Q. Zou, S. P. Wang, S. M. Tang, G. Z. Zhang. 2010. **Biological functions of microRNAs: a review.** J Physiol Biochem. 67(1):129-39.
- Jangra, R. K., M. Yi, y S. M. Lemon. 2010. **Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122.** J Virol. 84(13):6615-25.
- Jansen, C. C., y N. W. Beebe. 2010. **The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next.** Microbes and Infection 12:272-9.
- Johnson, C. D., A. Esquela-Kerscher, G. Stefani, M. Byrom, K. Kelnar, D. Ovcharenko, M. Wilson, X. Wang, J. Shelton, J. Shingara, L. Chin, D. Brown, y F. J. Slack. 2007. **The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells.** Cancer Research. Aug 15;67(16):7713-22.
- Jopling, C. L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, y P. Sarnow. 2005. **Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA.** Science. 2;309(5740):1577-81.
- Koyama A. H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, y A. Adachi. 2000. **Physiological significance of apoptosis in animal virus infection.** Microbes Infect. 2(9):1111-7.
- Kozlowski, P., J. Starega-Roslan, M. Legacz, M. Magnus, y W. J. Krzyzosiak. 2008. **Structures of microRNA precursors.** En S. Y. Ying (ed.), Current Perspectives in microRNA (miRNA). Springer Science + Business Media B. V. Los Angeles, CA.
- Lanford, R. E., E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen, y H. Ørum. 2010. **Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection.** Science. 8;327(5962):198-201.

- Laredo-Tiscareño, S. V., X. Guo, y V. Bocanegra-García. 2012. **Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular.** Ciencia Uat, 23(1):27-33.
- Larrea, E., R. Aldabe, I. Gonzalez, V. Segura, P. Sarobe, I. Echeverria, y J. Prieto. 2009. **Oncostatin M enhances the antiviral effects of type I interferon and activates immunostimulatory functions in liver epithelial cells.** Journal of Virology. Apr;83(7):3298-311.
- Lecellier, C. H., P. Dunoyer, K. Arar, J. Lehmann-Che, S. Eyquem, C. Himber, A. Saïb, y O. Voinnet. 2005. **A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells.** Science. 22;308(5721):557-60.
- Li, J., R. Huang R, W. Liao, Z. Chen, S. Zhang, y R. Huang. 2012. **Dengue virus utilizes calcium modulating cyclophilin-binding ligand to subvert apoptosis.** Biochemical and Biophysical Research Communications. Feb 24;418(4):622-7.
- Liao, H., J. Xu, y J. Huang. 2010. **FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells.** J Med Virol. Aug;82(8):1392-9.
- Lindenbach, B. D., H. J. Thiel, y C. M. Rice. 2007. **Flaviviridae: The virus and their replication.** En: D. M. Knipe, y P. M. Howley (eds.), Fields Virology. 1:1101-52. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia.
- Marianneau, P., A. Cardona, L. Edelman, V. Deubel, y P. Desprès. 1997. **Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death.** Journal of Virology. April; 71(4): 3244–3249.
- Matsuda, T., A. Almasan, M. Tomita, K. Tamaki, M. Saito, M. Tadano, H. Yagita, T. Ohta, y N. Mori. 2005. **Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.** Journal of General Virology. 86(Pt4):1055–1065.

- Miyaoka, Y., M. Tanaka, T. Naiki, y A. Miyajima. 2006 **Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways**. Journal of Biological Chemistry. Dec 8;281(49):37913-20.
- McLean, J. E., A. Wudzinska, E. Datan, D. Quaglino, y Z. Zakeri. 2011. **Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication**. J. Biol. Chem. Jun 24;286(25):22147-59.
- Murchison, E. P., y G. I. Hannon. 2004 **miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery**. Curr Opin Cell Biol. 16(3):223-9.
- Nadiminty, N., R. Tummala, W. Lou, Y. Zhu, X. B. Shi, J. X. Zou, H. Chen, J. Zhang, X. Chen, J. Luo, R. W. deVere White, H. J. Kung, C. P. Evans, y A. C. Gao. 2012. **MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth**. PLoS One. 7(3):e32832. doi: 10.1371/journal.pone.0032832.
- Nagila, A., J. Netsawang, A. Suttitheptumrong, A. Morchang, S. Khunchai, C. Srisawat, C. Puttikhunt, S. Noisakran, P. T. Yenchitsomanus, y T. Limjindaporn. 2013. **Inhibition of p38MAPK and CD137 signaling reduce dengue virus-induced TNF- α secretion and apoptosis**. Virology Journal. Apr 4;10(1):105.
- Nakamura, K., H. Nonaka, H. Saito, M. Tanaka, y A. Miyajima. 2004. **Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice**. Hepatology. Mar;39(3):635-44.
- Niles, A., K. Rashka, D. Bishop, R. Moravec, M O'Brien, y T. Riss. 2004. **Detect caspase-8 and -9 activities using the Caspase-Glo™ assays**. Cell Notes 8. Promega Corporation.
- Palmer, D. R., P. Sun, C. Celluzzi, J. Bisbing, S. Pang, W. Sun, M. A. Marovich, y T. Burgess. 2005. **Differential Effects of Dengue Virus**

- on Infected and Bystander Dendritic Cells.** Journal Of Virology. February; 79(4): 2432–39.
- Park, S. M., S. Shell, A. R. Radjabi, R. Schickel, C. Feig, B. Boyerinas, D. M. Dinulescu, E. Lengyel, y M. E. Peter. 2007. **Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2.** Cell Cycle. Nov 1;6(21):2585-90.
- Qiao, L., J. Yu, P. Dent, y G. Farrell. 2005. **NF-kappaB protects rat ARL-6 hepatocellular carcinoma cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis.** Cancer Biology & Therapy. Nov;4(11):1195-202.
- Qiao, L., H. Zhang, J. Yu, R. Francisco, P. Dent, M. P Ebert, C. Röcken, y G. Farrell. 2006. **Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role.** Human Gene Therapy. Mar;17(3):280-90.
- Qin, B., B. Xiao, D. Liang, Y. Li, T. Jiang, H. Yang. 2012. **MicroRNA let-7c inhibits Bcl-xl expression and regulates ox-LDL-induced endothelial apoptosis.** BMB Reports. Aug;45(8):464-9.
- Radtke, S., H. M. Hermanns, C. Haan, H. Schmitz-Van De Leur, H. Gascan, P. C. Heinrich, I. Behrmann. 2002. **Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression.** Journal of Biological Chemistry. Mar 29;277(13):11297-305.
- Roberts, A. P., A. P. Lewis, y C. L. Jopling. 2011. **miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components.** Nucleic Acids Res. 39:17 7716-29.
- Ross, T. M. 2010. **Dengue virus.** Clin Lab Med. Mar;30(1):149-60.
- Sayers, E. W., T. Barrett, D. A. Benson, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio, R. Edgar, S. Federhen, M. Feolo, L. Y. Geer, W. Helmberg, Y. Kapustin, D. Landsman, D. J. Lipman, T. L. Madden, D. R. Maglott, V. Miller, I. Mizrachi, J. Ostell, K. D. Pruitt, G. D. Schuler, E. Sequeira, S. T. Sherry, M. Shumway,

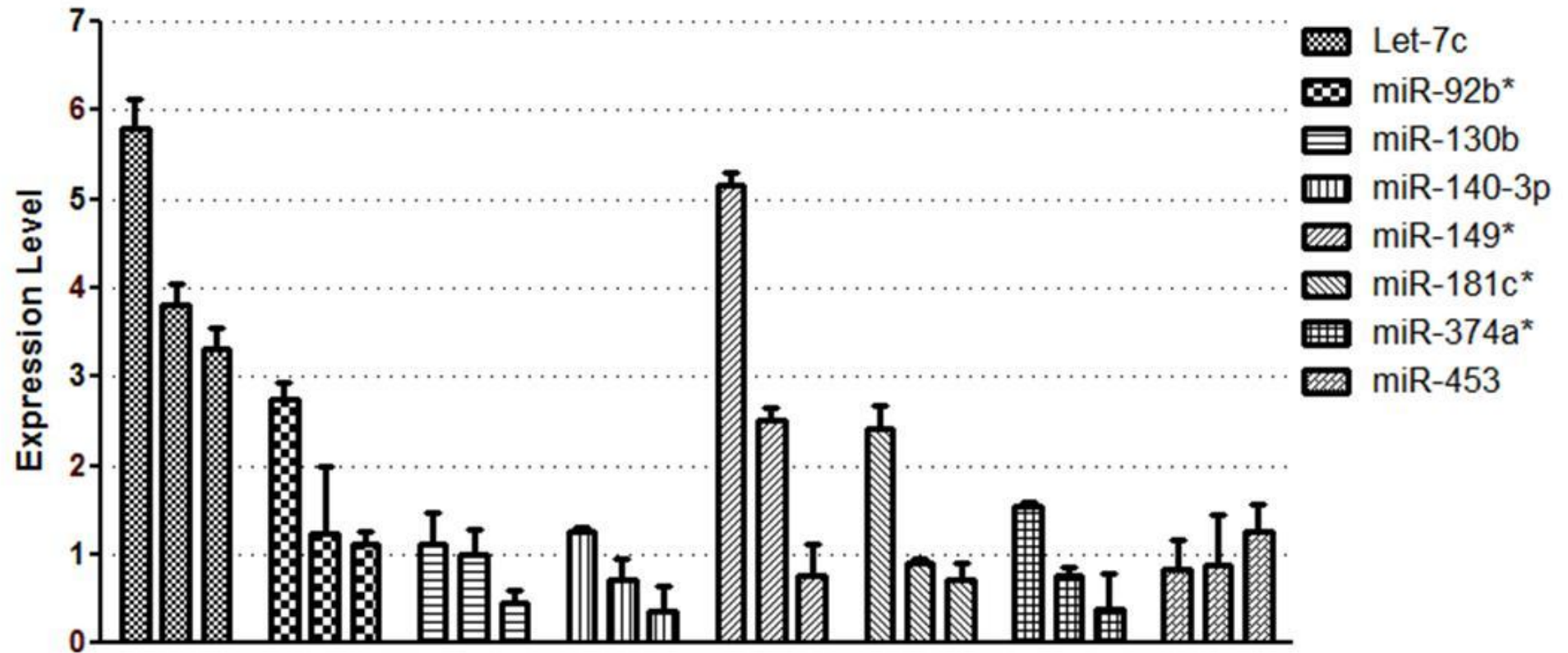
- K. Sirotkin, A. Souvorov, G. Starchenko, T. A. Tatusova, L. Wagner, E. Yaschenko, J. Ye. 2009. **Database resources of the National Center for Biotechnology Information**. Nucleic Acids Research. Jan;37(Database issue):D5-15. Epub 2008 Oct 21.
- Scaria, V., M. Hariharan, S. Maiti, B. Pillai, y S. K Brahmachari. 2006. **Host-virus interaction: a new role for microRNAs**. Retrovirology. 11;3:68.
- Schmaljohn, A. L., y D. McClain. 1996. **Alphaviruses (*Togaviridae*) and Flaviviruses (*Flaviviridae*)**. En S. Baron (ed.), Medical Microbiology. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.
- Seneviratne, S. L., G. N. Malavige, y H. J. de Silva. 2006. **Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 100(7):608-14.
- Shafee, N., y S. AbuBakar. 1996 (Noviembre 13-15). **Dengue 2 virus infection induces apoptosis in *in vitro* cell culture**. Poster presentado en: Second National Congress on Genetics, Genetics Society of Malaysia.
- Shafee, N., y S. AbuBakar. 2003. **Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis**. Journal of General Virology. 84, 2191–95.
- Shimizu, S., T. Takehara, H. Hikita, T. Kodama, T. Miyagi, A. Hosui, T. Tatsumi, H. Ishida, T. Noda, H. Nagano, Y. Doki, M. Mori, y N. Hayashi. 2010. **The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma**. Journal of Hepatology. May;52(5):698-704.
- Smith, D. R., y A. Khakpoor. 2009. **Involvement of the liver in dengue infections**. Dengue Bulletin. Volume 33.
- Smith, J. L., F. E. Grey, J. L. Uhrlaub, J. Nikolich-Zugich, y A. J. Hirsch. 2012. **Induction of the cellular microRNA, Hs_154, by West Nile**

- virus contributes to virus-mediated apoptosis through repression of antiapoptotic factors.** *Journal of Virology*. May;86(9):5278-87.
- Sundquist, T., R. Moravec, A. Niles, M. O'Brien, y R. Terry. 2006. **Timing your apoptosis assays.** *Cell Notes* 16. Promega Corporation.
- Tanaka, M., y A. Miyajima. 2003. **Oncostatin M, a multifunctional cytokine.** *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*. 149:39-52.
- Thongtan, T., S. Panyim, y D. R. Smith. 2004. **Apoptosis in dengue virus infected liver cell lines HepG2 and Hep3B.** *Journal of Medical Virology*. Mar;72(3):436-44.
- Tiffen, P. G., N. Omidvar, N. Marquez-Almuina, D. Croston, C. J Watson, y R. W. Clarkson. 2008. **A dual role for oncostatin M signaling in the differentiation and death of mammary epithelial cells in vivo.** *Molecular Endocrinology*. Dec;22(12):2677-88.
- Triboulet, R., B. Mari, Y. L. Lin, C. Chable-Bessia, Y. Bennasser, K. Lebrigand, B. Cardinaud, T. Maurin, P. Barbry, V. Baillat, J. Reynes, P. Corbeau, K. T. Jeang, y M. Benkirane. 2007. **Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication.** *Science* 315 (5818): 1579-82.
- Umbach, J. L., y B. R. Cullen. 2009. **The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity.** *Genes & Development*. 2009 May 15;23(10):1151-64.
- Wang, Y., O. Robledo, E. Kinzie, F. Blanchard, C. Richards, A. Miyajima, H. Baumann. 2000. **Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor.** *Journal of Biological Chemistry*. Aug 18;275(33):25273-85.
- Wang, Z. 2010. **MicroRNA: A matter of life or death.** *World J Biol Chem* 26; 1(4): 41-54.

- Wang, L., Y. Qin, L. Tong, S. Wu, Q. Wang, Q. Jiao, Z. Guo, L. Lin, R. Wang, W. Zhao, y Z. Zhong. 2012. **MiR-342-5p suppresses coxsackievirus B3 biosynthesis by targeting the 2C-coding region.** Antiviral Research. Feb;93(2):270-9.
- Welsch, S., S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C. K. Bleck P. Walther, S. D. Fuller, C. Antony, J. Krijnse-Locker, y R. Bartenschlager. 2009. **Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites.** Cell Host Microbe. Apr 23;5(4):365-75.
- Wessner, B., L. Gryadunov-Masutti, H. Tschan, N. Bachl, y E. Roth. 2010. **Is there a role for microRNAs in exercise immunology? A synopsis of current literature and future developments.** Exerc Immunol Rev. 16:22-39.
- Whitehead, S. S., J. E. Blaney, A. P. Durbin, y B. R. Murphy. 2007. **Prospects for a dengue virus vaccine.** Nature Reviews Microbiology 5(7), 518–528.
- World Health Organization. 2009 **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** WHO Library Cataloguing in Publication Data. France.
- Xiong, S., Y. Zheng, P. Jiang, R. Liu, X. Liu, y Y. Chu. 2011. **MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2.** Int J Biol Sci. 7(6):805-14.
- Ying, S. Y., J. D. Miller, y S. L. Lin. 2008. En K. Appasani (ed.), **MicroRNAs: from basic science to disease biology.** Cambridge University Press, New York.
- Zhang, Y., y F. J. Verbeek. 2010. **Comparison and integration of target prediction algorithms for microRNA studies.** Journal of Integrative Bioinformatics. Mar 25;7(3).
- Zheng, S. Q., Y. X. Li, Y. Zhang, X. Li, y H. Tang. 2011. **MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B.** Antiviral Research. Mar;89(3):219-26.

Znoyko, I., N. Sohara, S. S. Spicer, M. Trojanowska, y A. Reuben. 2005.
**Expression of oncostatin M and its receptors in normal and
cirrhotic human liver.** Journal of Hepatology. Nov;43(5):893-900.

ANEXO



Modulación de miRNAs ante la infección por dengue. Nivel de expresión de los microRNAs que se modulan de manera diferencial ante la infección por dengue en células hepáticas humanas Huh-7. El análisis se realizó 12, 24 y 48 h postinfección (Escalera, 2011).

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 18 de junio del 2013, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Biól. Alín Patricia Acuña Alonzo.

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Dr. Mauricio Castañón Arreola