

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

Efecto del miRNA-199b en el ciclo replicativo del virus del dengue

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
Méd. HORACIO EMMANUEL FONSECA SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2009

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.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy
Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

ASESORES

Dra. Rosa Maria del Ángel Núñez de Cáceres
Profesora Titular. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.
CINVESTAV-IPN.

Dra. Selene Zárate Guerra
Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Juan Ludert León
Profesor Titular. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.
CINVESTAV-IPN.

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias al apoyo académico y económico que me otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy así como en el Laboratorio de la Dra. Rosa Ma. Del Ángel del Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

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

A Reyna, David, Mario

Índice

Índice	V
Lista de Tablas	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Abreviaturas	I
Resumen	IV
Agradecimientos	VI
1. Introducción	1
1.1. El virus del dengue	1
1.1.1. Clasificación	1
1.1.2. Epidemiología	2
1.1.3. Ciclo infeccioso urbano y selvático	4
1.1.4. Fiebre por dengue	5
1.1.5. Estructura y organización genómica	6
1.1.6. Características de las proteínas virales	9
1.1.7. Ciclo de replicación de DENV	13
1.1.8. Tropismo celular	16
1.2. Los miRNAs	18
1.2.1. Procesos biológicos en los que participan los miRNAs	18
1.2.2. Biogénesis de los miRNAs	19
1.2.3. Regulación genética por miRNAs	21
1.2.4. Mecanismo de acción	22
1.2.5. Identificación de miRNAs	25

2. Antecedentes	27
2.1. MicroRNAs y Regulación del ciclo de replicación viral	27
2.1.1. Virus de la Hepatitis C y miRNA-122	27
2.1.2. Otros miRNAs endógenos y exógenos pueden regular la repli- cación de virus	28
2.2. Importancia del Estudio	31
3. Hipótesis	32
4. Objetivos	33
4.1. Objetivo General	33
4.2. Objetivos particulares	33
5. Materiales y Métodos	34
5.1. Estrategia Experimental	34
5.1.1. Determinación del miRNA candidato	34
5.1.2. Cuantificación de la expresión del miRNA-199b macrófagos no infectados e infectados con DENV-4.	36
5.1.3. Cuantificación del miRNA-199b por RT-PCR en Tiempo Real.	39
5.1.4. Transfección de los mimetizadores e inhibidores del miRNA- 199b en las células U937.	40
5.1.5. Extracción de RNA total de los cultivos celulares.	42
5.1.6. Determinación de la eficiencia de la replicación viral.	43
6. Resultados	46
6.1. Selección de un miRNA candidato	46
6.2. Expresión del miRNA-199b en cultivo primario de macrófagos y en la línea celular U937	48
6.3. Perfil de expresión del miRNA-199b durante la infección con DENV-4 en cultivo primario de macrófagos y en la línea celular U937.	51
6.4. Efecto de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-199b en la repli- cación DENV-4	54
6.4.1. Determinación del efecto de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-199b en el ciclo de replicación del DENV-4	57
7. Discusión y análisis de resultados	61
8. Conclusiones	66
Bibliografía	68

Índice de cuadros

1.1. Principales funciones de las proteínas codificadas por el DENV. . . .	10
5.1. Iniciadores evaluados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real en la detección del miRNA-199b	40
5.2. Iniciadores utilizados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real para la detección de DENV-4	43
6.1. Determinación con el programa ViTA de miRNAs con MREs en DENV- 4	47
6.2. miRNAs con blanco conservado en la 3'UTR de DENV-4	48
6.3. Datos descriptivos de los niveles basales del miRNA-199b en cultivo primario de macrófagos humanos en el perfil de infección con DENV-4	52
6.4. Análisis estadístico del perfil de expresión del miRNA-199b en células U937 a diferentes cinéticas de infección	54

Índice de figuras

1.1. Mapa de distribución geográfica global del DENV y de su vector <i>Aedes aegypti</i>	3
1.2. Ciclo urbano y enzoótico de propagación viral.	4
1.3. Representación esquemática de la organización genómica del DENV. .	7
1.4. Procesamiento de la poliproteína del DENV para generar las proteínas estructurales y no estructurales.	9
1.5. Ciclo de replicación del DENV.	15
5.1. Estrategia experimental General	35
5.2. Esquema de la amplificación de miRNAs por el método de miRVana .	41
6.1. RT-PCR de punto final para amplificar el miRNA-199b y 5S rRNA. .	49
6.2. Determinación del nivel de expresión basal del miRNA-199b en cultivo primario de macrófagos y en la línea celular U937.	50
6.3. Perfil de expresión del miRNA-199b en cultivo primario de macrófagos durante una cinética de infección con DENV-4.	52
6.4. Perfil de expresión del miRNA-199b en células U937 durante una cinética de infección con DENV-4.	53
6.5. RT-PCR punto final para amplificar DENV-4, HPRT1, PPI-A y 18S rRNA.	56
6.6. Productos de amplificación de la RT-PCR en tiempo real del genoma viral.	57

6.7. Productos de amplificación de la RT-PCR en tiempo real del gen de expresión constitutiva.	58
6.8. Efecto de los inhibidores y mimetizadores del miRNA-199b en el ciclo replicativo de DENV-4.	59
6.9. Efecto del miRNA-199b en el ciclo replicativo del DENV-4 en cada serie experimentos.	60

Lista de Abreviaturas

$eIF - 1\alpha$	Factor de inicio de la traducción eucarionte
$^{\circ}C$	Grados centígrados
μl	microlitros
μn	micromolar
18s rRNA	Gen del RNA ribosomal 18S
3UTR	Región no traducible 3 prima
5s rRNA	Gen del RNA ribosomal 5S
A2-4	Áreas conservadas(secuencias con estructura secundaria conservada)
ADE	Potenciación dependiente de anticuerpos
CM	Membranas confluentes
CS	Secuencia de Ciclización
DB	Con morfología de pesa
DENV	Virus del Dengue
DHF	Fibre hemorrágica por dengue
h	horas

HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPRT-1	Gen de la Hipoxantina fosforibosil transferasa-1
IFN	Interferon
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
MER	Elemento de reconocimiento a miRNA
min	minutos
miRNA	microRNA, también puede ser llamado miR
nM	Nanomolar
NS	No estructural
nts	nucleótidos
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RT	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PFV-1	Virus espumoso de primate tipo 1
PPI-A	Gen de la Peptidil-isomerasa-A también conocida como Ciclofilina-A
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
s	segundos
SFB	Suero fetal bovino
SL	Tallo burbuja
SV40	Virus Simiano 40

T _m	Temperatura de fusión
TRBP	Proteína de unión de elemento TAR
UAR	Región río arriba al ATG
v-miRNAs	microRNAs exógenos de origen viral
VP	Paquete Vesicular
VR	Región Variable
WNV	Virus del Oeste del Nilo
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla

Resumen

La infección por el virus del dengue activa diversos procesos en la célula huésped, los cuales buscan inhibir el ciclo replicativo del virus y así la diseminación de la infección. Entre los mecanismos de defensa antiviral que se han descrito más recientemente, se encuentran los miRNAs, cuya función es modular la expresión genética mediante el bloqueo de la traducción y en algunos casos también la degradación de los RNA mensajeros. Las funciones asociadas a los miRNAs se inician por la interacción de dichos RNAs pequeños principalmente en la 3'UTR (del inglés, *untranslated region*) del transcrito blanco.

En el presente trabajo, se planteó investigar la posible regulación por parte de los miRNAs sobre el ciclo replicativo del virus dengue y para ello mediante búsqueda bioinformática se identificó miRNAs con probables blancos sobre la región 3'UTR del virus. A partir de este análisis se seleccionó un miRNA para desarrollar el proyecto. El miRNA elegido fue 199b ya que se predijo una interacción con una secuencia indispensable para la viabilidad viral.

Primeramente, se obtuvo el perfil de expresión del miRNA en cultivos de macrófagos humanos en una cinética de infección. Los resultados indican que la infección viral produce cambios en la expresión del miRNA.

Para definir el efecto de dicho miRNA en el ciclo replicativo viral, las células se transfectaron con mimetizadores e inhibidores de su función, se infectaron con el virus del dengue y se determinó la eficiencia de replicación del virus mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos muestran una tendencia decreciente en el número de copias virales cuando se transfecta el mimetizador y lo contrario en el

caso del inhibidor, sin embargo, estas tendencias no son significativas.

Agradecimientos

En primer lugar me siento muy agradecido por la suerte de haber contado con la fuerza, el amor y el apoyo de mi familia. De manera particular, a mi madre a mis hermanos, a mi tía Josefina, a mis tíos Armando y Gerardo así como a Laura Belmont.

Me gustaría agradecer a la Dra Martha Yocupicio, mi directora de tesis por darme la oportunidad de participar en el desarrollo de una parte de su línea de investigación.

También me he sentido afortunado por contar con la enriquecedora asesoría académica en el proyecto de investigación de los doctores Rosa María del Ángel, Selene Zárate, Juan Ludert y Mauricio Castañón; pero de manera particular, a la dra. del Ángel quién además contribuyó con la infraestructura de su laboratorio de virología el Centro de Estudios Avanzados del Politécnico Nacional.

A mis amigos Fernando Vargas, Helios Cárdenas, Clemente Mosso, Henry Puerta, Manuel Escalera, Eduardo Álvarez y Karen Miranda; quienes me apoyaron académicamente así como con su amistad durante este periodo de tiempo.

A la invaluable planta académica del posgrado en Ciencias Genómicas que me formó, con aprecio particular a los doctores Máximo Martínez, Mávil y César López.

Distrito Federal, México
Septiembre 25, 2009

Horacio Emmanuel Fonseca Sánchez

Capítulo 1

Introducción

1.1. El virus del dengue

1.1.1. Clasificación

El DENV es un patógeno del grupo IV de Baltimore que taxonómicamente está incluido en la familia *Flaviviridae* y en el género *Flavivirus* [1, 2]. Serológicamente se distinguen 4 tipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 que fueron agrupados a partir de reacciones de neutralización con anticuerpos contra la proteína de la envoltura viral [3, 4]. Se han descrito distintos genotipos del virus del dengue que corresponden a un virus aislado y secuenciado de algún brote epidémico destacándose el Americano, el Asiático-Americano, el del Sudeste de Asia y el Cosmopolita. Por genómica comparativa se ha encontrado alrededor de 30 % de divergencia entre los distintos serotipos de DENV a nivel de la secuencia codificante [5].

1.1.1.1. Familia *Flaviviridae*

Desde que Walter Reed demostró la capacidad de transmisión del virus de la fiebre amarilla (YFV) en humanos por mosquitos infectados, se despertó un gran interés

por estudiar virus con este tipo de ciclo infeccioso [6]. Los virus de la familia *Flaviviridae* (del latín *flavus* amarillo) se compone de tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y un grupo de virus aún sin clasificar denominados agentes *GB* [2].

Anteriormente la familia *Flaviviridae* junto con otras como la *Togaviridae* o *Bunyaviridae* fueron clasificados como miembros de un grupo denominado *Arbovirus* (del inglés *arthropod-born virus*) dentro de la familia *Togaviridae* debido a que compartían características físico-químicas con virus de esta familia. Casals y Brown separaron por primera vez a la familia *Flaviviridae* del resto de los *Arbovirus* en el grupo B [7]. Posteriormente cuando se describieron con mayor detalle: genes, estructura y ciclo de replicación virales, se hizo evidente que la familia *Flaviviridae* representa un grupo evolutivo distinto y debía ser agrupada aparte [5].

El género *Flavivirus* esta compuesto de 73 virus de los cuales 34 son transmitidos por picadura de mosquito, 17 por garrapata, y el resto son agentes zoonóticos transmitidos por vectores desconocidos transmitidos a ratones y murciélagos. Cuarenta especies de la familia *Flaviviridae* han sido asociadas con alguna enfermedad humana, de los cuales 22 (incluyendo al DENV), son transmitidos por picadura de mosquito, 13 por garrapata y 5 más de los que no se conoce su vector [5].

A pesar de que los miembros de esta familia de virus son muy similares exhiben propiedades biológicas diferentes y carecen de reactividad cruzada a anticuerpos neutralizantes [8].

1.1.2. Epidemiología

El dengue es una enfermedad viral transmitida al humano por el piquete del mosquito del género *Aedes sp.* y se estima que 50-100 millones de personas se infectan con

este virus alrededor del mundo. El riesgo de infección es muy alto, ya que aproximadamente 2.5 mil millones de personas viven en regiones tropicales y subtropicales, donde el DENV es endémico. A esta cantidad deben sumarse casi alrededor de 120 millones de turistas que visitan estas áreas cada año [9]. Debido a que la mayor parte de las infecciones por DENV pueden ser asintomáticas, es muy probable que el reporte de casos se encuentre subdiagnosticado.

Desde 1999, la Organización Mundial de la Salud considera a la infección por DENV un problema de salud pública y a partir de 2005 la incluye como una enfermedad emergente de importancia internacional. El DENV y sus vectores ocupan las regiones del sudeste de Asia, América así como islas del oeste del Pacífico que se han expandido geográficamente en las últimas tres décadas como resultado de cambios demográficos, optimización en los medios de transporte, el cambio climático así como la falla en las medidas de control (Figura1.1) [9].

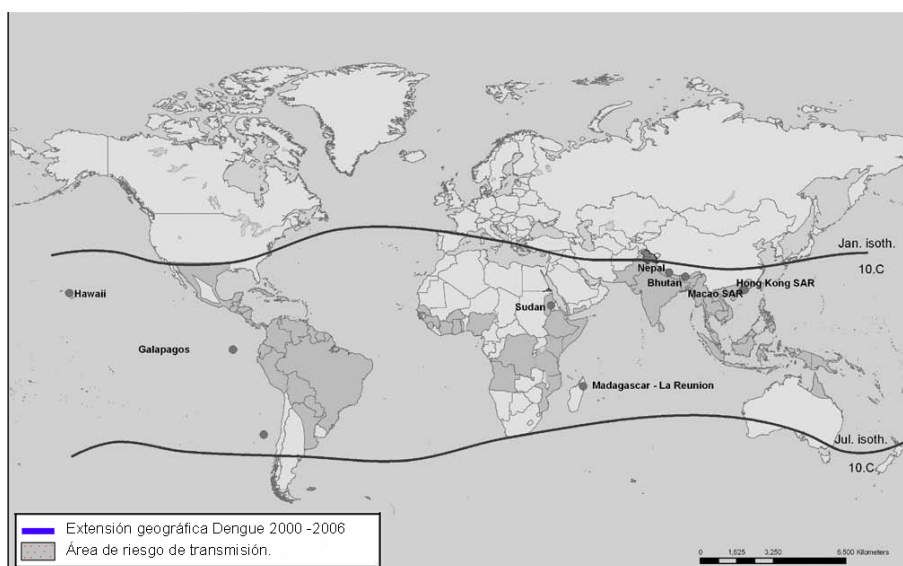


Figura 1.1: Mapa de distribución geográfica global del DENV y de su vector *Aedes aegypti* [9].

Los cuatro serotipos del DENV circulan en la región panamericana siendo DENV-2 el mas extendido seguido de DENV-1, abarcando una región similar comprendida desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina. Los serotipos DENV-3 y DENV-4 afectan regiones menos extensas. En México, los serotipos que principalmente circulan son DENV-1, DENV-2 y DENV-3 [10].

1.1.3. Ciclo infeccioso urbano y selvático

En 1906 se demostró por primera vez que la transmisión del DENV es a través del vector *Aedes aegypti*, y en 1931 se identificó que *Aedes albopictus* también era capaz de transmitir esta enfermedad (ambas del subgénero *Stegomyia*); sin embargo otras especies del género pueden transmitir la enfermedad [11, 12].

Además de infectar al humano, el DENV puede propagarse en primates y en el mosquito (Figura 1.2) [13]. Cuando la secuencia de infección solo afecta al hombre y al mosquito se habla de un ciclo de infección urbano, lo que ha favorecido el ciclo infeccioso del DENV [14].

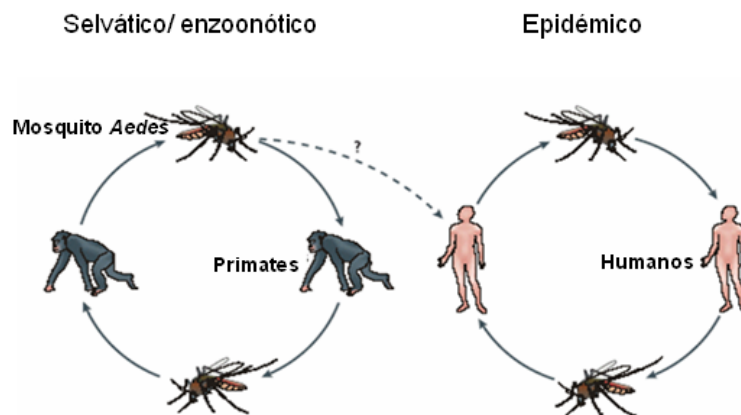


Figura 1.2: Ciclo urbano y enzoótico de propagación viral [14].

El DENV puede infectar asintomáticamente otros primates y desde 1965 se habla formalmente de un ciclo forestal o selvático en el que el DENV puede replicarse muchas veces sin entrar en contacto con el hombre. Por lo tanto, la existencia de este tipo de reservorios biológicos dificultará la posible erradicación de este virus [15, 16].

1.1.4. Fiebre por dengue

La fiebre por dengue fue la segunda enfermedad humana atribuida a un virus y su nombre se puede derivar de la expresión suahelí (en la costa de África Oriental) "*Ka-Dinga pepo*" utilizada para describir una enfermedad causada por un espíritu maligno [17]. El DENV ocasiona una infección aguda caracterizada por fiebre con dolor intenso de huesos y músculos, dolor en diferentes partes del cuerpo, postración, lesiones cutáneas máculo papulares, linfadenopatía y leucopenia. La recuperación provee inmunidad total contra el serotipo causante pero sólo parcial y transitoria en infecciones subsecuentes por cualquiera de los otros tres serotipos [18]. La fiebre hemorrágica por dengue o *DHF* (del inglés *dengue haemorrhagic fever*) es una enfermedad febril severa caracterizada por anormalidades en la hemostasia y un aumento en la permeabilidad vascular, que en algunas circunstancias puede terminar en choque [19]. La DHF fue descrita por primera vez en los cincuenta durante epidemias por dengue en las Filipinas y Tailandia. Se estima que cada año ocurren 500,000 hospitalizaciones por DHF que dan lugar a entre 20,000 a 25,000 muertes, principalmente en niños [20].

Las complicaciones aparecen con más frecuencia cuando individuos previamente inmunizados con un serotipo, posteriormente se infectan con serotipo distinto. Se ha reportado mayor riesgo cuando la secuencia en infección es DENV-1/DENV-2 y DENV-1/DENV-3 [21, 18].

Una de las hipótesis más conocidas para explicar la gravedad de la DHF ha sido la

teoría del potenciamiento inmune (ADE, del inglés *antibody dependent enhancement*) en la cual la entrada del virus es mediada por anticuerpos generados durante una infección previa; estos anticuerpos forman complejos que incorporan partículas virales al formar un complejo antígeno anticuerpo a través del receptor Fc [22, 23].

Esta teoría explica que los anticuerpos creados contra una infección previa con un serotipo diferente pueden interaccionar con el virus, pero cuando la concentración de anticuerpos no alcanza a neutralizarlo, los complejos se unen a las células del sistema inmunológico y así puede facilitarse la entrada del virus a la célula [22, 23]. La DHF ha sido relacionada con permeabilidad vascular incrementada, lo que podría asociarse con la actividad de citocinas como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8 [24, 23]. La variación en el cuadro clínico atribuidas a etnicidad, edad y estado nutricional son poco entendidas [19].

1.1.5. Estructura y organización genómica

El genoma del DENV consiste de una cadena de RNA de aproximadamente 11 Kb con un solo marco de lectura abierto que es policistrónico, flanqueado por dos regiones no traducibles (Figura 1.3). El RNA genómico es de polaridad positiva, así que se comporta como un mRNA. La amplificación del RNA genómico se lleva a cabo mediante la síntesis de un RNA complementario a partir del RNA genómico, el cual posteriormente sirve como molde para generar más RNA genómico.

El genoma viral adquiere conformaciones secundarias y terciarias muy conservadas que funcionan como elementos de acción-*cis* (secuencias con capacidad de regulación genética en el mismo genoma), capaces de dirigir el proceso de replicación viral al unirse con elementos de acción-*trans* (proteínas), tanto del hospedero como del propio virus [5].

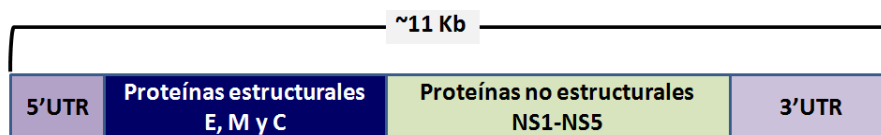


Figura 1.3: Representación esquemática de la organización genómica del DENV. El genoma del DENV es de aproximadamente 11 Kb y contiene un sólo marco de lectura abierto y dos regiones no traducibles en cada extremo.

1.1.5.1. Principales características de la 5'UTR

La 5'UTR consiste de aproximadamente 100 nucleótidos (nts) poco conservados entre los flavivirus y contienen en el extremo una estructura Cap tipo I, que tiene la función de reclutar factores del inicio de la traducción, además de proveer una protección contra la acción de *RNAsas* [5]. La 3'UTR del RNA de polaridad negativa es la responsable de la síntesis de nuevas cadenas de RNA de polaridad positiva y al parecer es capaz de interactuar con proteínas celulares que contienen motivos de reconocimiento de RNA que intervienen en la traducción [5, 25, 26, 27].

La 5'UTR contiene una secuencia conservada entre los *Flavivirus* (UCAAUAUG-CUG) denominada 5'CS (del inglés *cycling sequence*) que permite la circularización del genoma viral al interactuar con su secuencia complementaria que se encuentra en la región 3'UTR. Recientemente se describió la secuencia 5'UAR (del inglés *upstream ATG region*) adyacente río arriba que también tiene propiedades de complementación con su contraparte en la 3'UTR y también participa en la circularización del genoma viral. Como en otros virus, se ha demostrado que la circularización del genoma es determinante para la replicación viral [28, 29, 30].

1.1.5.2. Principales características de la 3'UTR

La región 3'UTR consta de aproximadamente 450 nts, tiene un papel análogo a la cola de poliA de los mRNAs de eucariontes y se subdivide en varias regiones de acuerdo a su conformación secundaria y la funcionalidad de estructuras. De extremo 5' a 3' e inmediatamente después del codón de paro, se encuentra una estructura variable o VR (del inglés *variable region*), dos estructuras con morfología similar a una barra de pesas llamadas DB2 y DB1 (del inglés *dumbulbell*), una secuencia de circularización 3'CS y dos estructuras tipo tallo-burbuja de diferente tamaño SLB y SLA (del inglés *stem-loop*)¹ [33]. Esta región funciona como promotor de la síntesis del RNA de polaridad negativa, sin embargo, muestra una gran heterogeneidad entre los flavivirus, aunque entre grupos taxonómicos se encuentran secuencias y estructuras muy conservadas, principalmente cercanas al extremo 3'. Durante la replicación del genoma viral, la 3'CS y la 3'UAR mantienen una asociación tipo Watson y Crick con sus contrapartes localizadas en el extremo 5' del genoma [28].

Se ha reportado que en el Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) las proteínas virales pertenecientes al complejo de replicación viral NS3 y NS5 pueden unirse a la región 3'UTR sin embargo en el caso del DENV sólo se ha identificado esta propiedad en NS3 del DENV-1 [34, 35].

La SLA que forma la región terminal del genoma del dengue ha sido reportada como importante en la replicación del DENV-2. En el caso del virus del Oeste del Nilo (WNV), se ha demostrado que esta estructura es capaz de unirse a proteínas reguladoras de la traducción y de la replicación, entre ellas el factor del inicio de la traducción $eIF - 1\alpha$ [36, 37, 38].

¹Otros autores denominan los distintos segmentos de la 3'UTR como VR, A2, A3 y A4 [31, 32]

1.1.6. Características de las proteínas virales

El DENV contiene un marco de lectura abierto que al traducirse da lugar a una poliproteína co-postraducionalmente modificada, dando origen a tres proteínas estructurales (C, prM, E) y siete proteínas no estructurales ó NS (del inglés *non structural*) llamadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Figura 1.4) [5]. El cuadro 1.1 resume las principales funciones de las proteínas codificadas por el DENV.

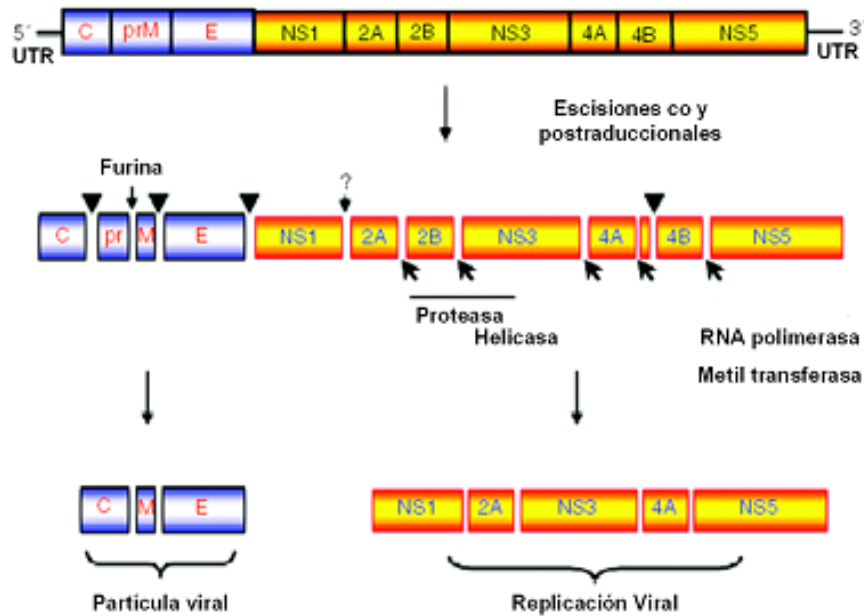


Figura 1.4: **Procesamiento de la poliproteína de DENV.** La poliproteína se procesa por la proteasa celular Furina y por el complejo enzimático viral NS2B-NS3 para generar las proteínas estructurales y no estructurales.

1.1.6.1. Proteínas estructurales

Proteína de la Envoltura. La glicoproteína E es una molécula de 55 kDa que provee el primer punto de contacto entre el virus y la célula hospedera. En la célula

Cuadro 1.1: Principales funciones de las proteínas codificadas por el DENV.

Proteína	Función
C	Empaquetamiento del genoma
M	Soporte de la envoltura. Incorporación de la proteína E.
E	Unión a receptores celulares; Fusión y entrada. Antigenicidad.
NS1	Acumulación de RNA de polaridad negativa
NS2A	Forma parte del complejo de replicación, anclaje a membranas.
NS2B	Cofactor de NS3 para su funcionamiento como proteasa.
NS3	Serina proteasa, Helicasa
NS4A	Anclaje y remodelamiento de membranas.
NS4B	Anclaje a membranas, inhibidor del la vía del interferon, fosforilación de NS5.
NS5	Metil-transferasa, RNA polimerasa

hospedera se han identificado algunas proteínas y carbohidratos que tienen la capacidad de interactuar con la proteína E y que podrían tener un papel en la unión y entrada. Dichas moléculas son DC-SIGN, HSP-90, HSP-70, HSC-70, Rab-5, Receptor de manosa, Heparán Sulfato y GRP-78 [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46].

Además de mediar la unión a las moléculas receptoras en la superficie celular, la proteína E también participa activamente durante la fusión de la membrana endosómica con la viral y se encuentra en posición tangencial a la membrana viral y forma una red icosaédrica. Las proteínas de fusión se localizan en la superficie de viriones maduros en un estado metaestable que al interactuar con el receptor y cambios de pH adopta una nueva conformación capaz de acercar y sobreponer la membrana viral con la celular. Durante el cambio conformacional, la proteína expone el péptido de fusión, responsable de insertarse en la membrana celular para iniciar el proceso de fusión [47, 48, 48].

Proteína de la Cápside. La proteína de la cápside (C) tienen un peso molecular de 12 kDa, y es la responsable de formar un complejo con el RNA viral. El segmento hidrofóbico funciona como un dominio de anclaje a membrana que adquiere una

conformación de horquilla exponiendo sus extremos cargados positivamente para el empaquetamiento del genoma viral [49].

Proteína de la Membrana. La glicoproteína M de 22 kDa se procesa de un precursor llamado prM, el cual tiene una secuencia señal que le permite insertarse en membranas siendo necesaria para la incorporación de la proteína E al virus [50].

1.1.6.2. Proteínas no estructurales

Proteína NS1. La proteína NS1 es una glicoproteína de 41.8 kDa, muy conservada entre los flavivirus que está implicada en los estadios tempranos de la replicación viral. Por ensayos de transcomplementación y de mutagénesis dirigida, se ha propuesto que el papel fundamental de esta proteína es participar en la síntesis y acumulación de la cadena negativa del RNA viral [51, 52]. Esta proteína puede ser detectada en tiempos tempranos después de la infección y su expresión se correlaciona con el título viral en pacientes y en cultivos celulares [53, 54].

Proteína NS2A. Es una proteína hidrofóbica de alrededor de 25 kDa y se ha reportado su asociación con el complejo de replicación viral inmerso en estructuras membranales de las partículas vesiculares [55].

Proteína NS2B. Esta proteína tiene un peso molecular de 14 kDa y su principal función es actuar como cofactor para la actividad de serina proteasa de la proteína NS3 [5].

Proteína NS3. Proteína con un peso molecular de 69.5 kDa que se asocia con NS2B para llevar a cabo el procesamiento de la poliproteína viral y tiene un dominio de proteasa en los primeros 180 aminoácidos [55]. En el extremo C-terminal se encuentra un dominio helicasa tipo DEXH de dsRNA que está involucrado en el proceso de replicación del genoma viral. Así mismo, posee un dominio de asociación con NS5 para

la formación del complejo de replicación y también se ha determinado su capacidad de interaccionar con regiones específicas de la 3'UTR [56, 57, 34].

Proteína NS4A. Es una proteína de 13.8 kDa muy poco conservada entre los Flavivirus. NS4A contiene un tercio N-terminal hidrofílico localizado en el citoplasma y dos tercios C-terminales hidrofóbicos anclados a la membrana del RER. Esta proteína es un componente del complejo de replicación unido a membrana y se propone que el segmento hidrófobo es el responsable de inducir alteraciones membranales en el hospedero [5, 58].

Proteína NS4B. Es una proteína de 26.7 kDa que puede formar parte del complejo de replicación y estar involucrada en la localización de NS3 [59]. Por otro lado NS4B bloquea la transducción de señales por interferón (IFN) al inhibir la fosforilación de STAT1 e inhibir la expresión de STAT2, sin embargo, también se ha sugerido que puede participar en las cascadas de señalización de NF- κ B, AP-1 y SRE [60, 61]. Por otro lado, se debe considerar la posibilidad de que la inhibición de la vía del IFN no sea un papel exclusivo de NS4B ya que en ensayos con otros flavivirus esta propiedad se le confiere también a la proteína NS5 [62, 63, 64, 65, 66].

Proteína NS5. Es la proteína viral más grande (104 kDa) y conservada entre los DENV siendo su localización citoplásmica y nuclear [67, 68]. Es una proteína que se ha asociado con tres funciones: a) en su extremo amino terminal tiene un dominio metil transferasa (residuos 1-296) involucrado en la catálisis de la metilación N7 y ribosa 2'OH para la formación del Cap del genoma viral, b) en su extremo carboxilo terminal tiene el dominio RdRP ó Polimerasa dependiente de RNA (residuos 320-900) necesario para la síntesis del RNA viral, c) también posee la actividad de metil-transferasa, esencial para el ciclo de replicativo viral, lo cual podría representar un

nuevo blanco terapéutico [69, 67, 70, 71]. Así mismo, se ha observado que tiene un dominio helicasa [57].

Se ha reportado esta proteína tiene diversos estados de fosforilación que correlacionan con su estado de activación [57]. La estructura cristalográfica de las RdRPs de los flavivirus muestran que esta proteína asume la conformación de una mano derecha con los subdominios: palma, dedos y pulgar [72]. La función de NS5 es replicar el genoma viral en un evento continuo de polimerización, el cual inicia en el extremo 3'UTR para producir la cadena complementaria mediante síntesis *de novo* en presencia de Mn^{2+} ó Mg^{2+} [73]. Se ha demostrado que las RdRPs llevan a cabo su función biológica interaccionando con proteínas virales y del hospedero así como en asociación directa con el RNA viral.

Por todo lo anterior las RdRPs han sido un blanco en desarrollo para terapias farmacológicas que tienen como objetivo inhibir la multiplicación viral [74]. Cabe mencionar que en otros flavivirus, NS5 ha sido implicada en la inhibición de la vía del IFN [75, 63, 64, 62, 76].

1.1.7. Ciclo de replicación de DENV

Cuando un mosquito infectado con DENV pica al humano, introduce al virus al torrente sanguíneo o al tejido conectivo; después de su unión a su célula blanco (principalmente macrófagos y células dendríticas) es transportado a los ganglios linfáticos regionales [77]. Cuando una partícula viral infectante interacciona con su célula blanco, se adhiere a la membrana celular por medio de interacciones entre sus glicoproteínas de superficie a uno o varios receptores celulares y posteriormente se internaliza por endocitosis mediada por receptor [40, 42, 43, 78].

Se ha reportado que el virus transportado por endosomas puede ser encontrado en

los endosomas tardíos aproximadamente 30 minutos después de su entrada. Durante la maduración del endosoma el pH disminuye, y en el endosoma tardío, el ambiente ácido es suficiente para cambiar la conformación de la proteína E y permitir la liberación de la nucleocápside al citoplasma por un mecanismo de fusión. Una vez en el citoplasma, la cápside se disocia y el RNA viral comienza a traducirse [46, 78].

En células infectadas con el virus se distinguen dos tipos de compartimientos: membranas confluentes o *CM* (del inglés *confluent membranes*) denominadas centros de traducción debido a la abundancia de complejos NS2B–NS3, mientras que el segundo compartimiento llamado paquete vesicular o *VP* (del inglés *vesicular package*) funge como centro replicativo donde las proteínas NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS5 y las moléculas de RNA doble cadena son abundantes [29].

El RNA de polaridad positiva recién sintetizado en *VP* pasa al compartimento *CM* para iniciar el ensamblaje y transporte a través del RER y el Complejo de Golgi (CG). La proteína C con carga positiva atrae al RNA (de carga neta negativa) e inicia el ensamblaje del virus. La unión de las proteínas virales da como resultado una estructura icosaédrica de 50 nm que tiene una cubierta protéica bien organizada y una doble membrana en la que se insertarán la proteína E y M. El virión recién ensamblado madura mientras se transloca por la vía de secreción de proteínas y finalmente se libera por exocitosis y/o por lisis celular (Figura 1.5) [29].

En el ciclo infeccioso, los virus liberados al torrente sanguíneo son absorbidos por mosquitos *Aedes* sanos al alimentarse de un humano enfermo. Los virus ingeridos por el artrópodo, llevan a cabo un nuevo ciclo de replicación viral en las células del intestino medio [79]. Los virus recién replicados son transportados por el hemocele y la hemolinfa a diversos tejidos del mosquito y cuando alcanza las glándulas salivales del

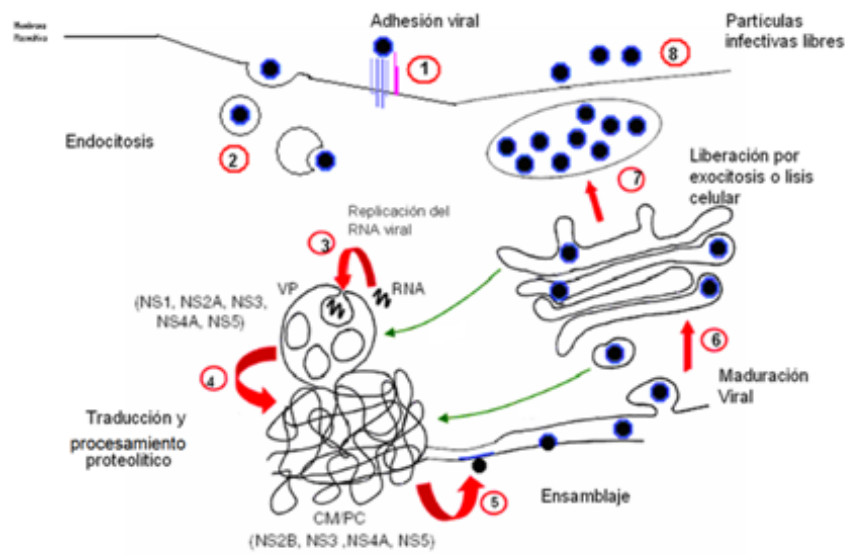


Figura 1.5: **Ciclo de replicación del DENV.** El ciclo de replicación del DENV comienza con la adhesión viral (1), se lleva a cabo la internalización (2), replicación y traducción del genoma viral (3-4), ensamblaje (5), maduración viral (6) y liberación por exocitosis o lisis celular (7) de la progenie viral infecciosa (8)

insecto nuevamente se replica y está listo para infectar al humano. Este proceso tarda alrededor de 10-14 días [79]. Se ha sugerido un mecanismo de infección transovárica en el cual el virus en hembras infectadas puede invadir los huevos de mosquito permitiendo la propagación viral sin necesidad de la participación del humano [13]. También se ha reportado que el DENV puede ser transmitido sexualmente por insectos machos a las hembras [13].

1.1.8. Tropismo celular

El concepto de tropismo se refiere a la susceptibilidad específica de un cierto tipo celular por ser infectado por un patógeno. Dicha susceptibilidad es determinada por la expresión de receptores membranales y componentes intracelulares que favorecen la infección y multiplicación del agente infeccioso [5].

En el humano, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas (CDs) son los principales blancos del DENV; sin embargo existen otras células capaces de sostener la infección como las endoteliales venosas de cordón umbilical [80, 81, 77, 24]. Se ha demostrado que las CDs son 10 veces más permisivas para la infección por DENV que monocitos o macrófagos [77]. Las CDs son muy susceptibles a la infección en parte probablemente debido a que son especializadas en presentar antígenos. Otro factor que podría contribuir a la alta susceptibilidad de este linaje celular a la infección con DENV es que las CDs inmaduras son muy eficientes capturando patógenos a través de la fagocitosis y la endocitosis. Las CDs tienen receptores capturantes de antígenos, como DC-SIGN y receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas moléculas que se han sugerido como responsables de la entrada del virus en este tipo de células [22, 24, 23].

Después de que un patógeno es capturado, las CDs abandonan los tejidos, maduran y migran a los órganos linfoides secundarios donde llevarán a cabo procesos relacionados con la activación de la respuesta inmune [80].

Un gran número de líneas celulares han sido reportadas como permisivas de infección por el DENV, por ejemplo: las células Vero (del inglés *African Green monkey kidney*), LLC-MK2 (del inglés *Rhesus monkey kidney cells*) BHK-21 (del inglés *baby hamster kidney*) y HepG2 (del inglés *human hepatoma*), Macrófagos humanos como U937, THP-1 y HL-60 [82].

1.2. Los miRNAs

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes con la propiedad de regular genes a diversos niveles, fueron descritos por primera vez al estudiar la sincronización del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Los miRNAs son moléculas de ~ 22 nucleótidos sintetizados a partir de transcritos precursores tipo tallo-burbuja de mayor longitud. Los miRNAs *let-4* y *let-7* fueron los primeros miRNAs descritos y ejercen su función al reprimir traduccionalmente genes de la fase larvaria para favorecer el progreso de la etapa adulta [83, 84, 85]. El mecanismo regulatorio fue reportado como una interacción entre miRNAs y elementos de reconocimiento a miRNAs (MREs) en las 3'UTR de ciertos RNAs mensajeros (mRNAs) [86, 87]. El interés por los miRNAs aumentó al observarse que este tipo de regulación estaba extendida a otros organismos como insectos, plantas y mamíferos [88]. En 2001, cientos de estos RNAs fueron denominados por primera vez *miRNAs* [89]. En la actualidad se estima que los miRNAs representan más del 3 % de los genes humanos y controlan la expresión de otros miles.

1.2.1. Procesos biológicos en los que participan los miRNAs

Los miRNAs han sido vinculados en la regulación de prácticamente todos los procesos celulares conocidos, por ejemplo: en el desarrollo, la proliferación celular y el metabolismo [90, 91, 92, 93, 94]. Debido a la gran gama de funciones que éstos desempeñan, es de esperarse que las alteraciones en la fisiología de los miRNAs tenga como resultado el desarrollo de enfermedades como el cáncer [95, 96]. Además, recientemente se ha demostrado que los miRNAs pueden regular el ciclo replicativo de diversos tipos de virus [97, 98, 99].

1.2.2. Biogénesis de los miRNAs

La mayor parte de los miRNAs se encuentran codificados en regiones intergénicas ó de intrones y se transcriben principalmente por la RNA polimerasa II y en algunos casos por la RNA Polimerasa III [100, 101]. La generación de los miRNAs requiere varias etapas, siendo la primera la generación de transcritos primarios o pri-miRNAs que se procesan en el núcleo para generar los pre-miRNAs, los cuales se transportan al citoplasma donde mediante la acción de una endonucleasa se generan los microRNAs en su forma biológicamente activa [102].

Los pri-miRNAs son estructuras tipo tallo burbuja con una longitud promedio de 65 nts (incluso kilobases), los pre-miRNAs también son estructuras tallo burbuja pero con un tamaño de aproximadamente 60 nts de RNA doble cadena, los miRNAs inmaduros son estructuras de aproximadamente 22 nts de RNA de doble cadena y por último los miRNAs maduros de aproximadamente 22 nts de RNA de cadena sencilla [100].

Los componentes enzimáticos que procesan pri-miRNAs en miRNAs maduros en las células de mamífero, inician con la acción del complejo nuclear llamado Microprocesador, el cual está compuesto por dos proteínas principales: Drosha, que es una RNAsa tipo III y DGCR8, que tiene por propiedad el unirse a RNA de doble cadena así como de estabilizar el complejo enzimático [103, 104]. El microprocesador reconoce a los pri-miRNAs a través del dominio DGCR8 y posteriormente Drosha corta el tallo dejando extremos asimétricos en el que el extremo 3' excede en 2 ó 3 nts al extremo 5'. La asimetría entre extremos del tallo es importante para el transporte y posteriormente para el reconocimiento de la siguiente nucleasa [105]. Los pre-miRNAs son transportados del núcleo al citoplasma por el sistema de transporte nuclear Exportina

5- Ran GTP [106, 107]. Cuando un pre-miRNA proviene directamente de un intron sin ser procesado previamente por el Microprocesador se denomina *mirtron*. Los pre-*mirtrones* son exportados del núcleo al citoplasma por Exportina 5. Se propone que la vía de los *mirtrones* pudo haber estado funcionando en momentos tempranos de la evolución anteriores a la aparición de Drosha [108, 109].

En la segunda etapa de procesamiento, los pre-miRNAs son cortados por el complejo enzimático denominado Dicer, que se compone de Dicer (RNAsas tipo III) y que en el humano se asocia con otras proteínas de unión a RNA de doble cadena como TRBP (del inglés *transacting responsive RNA element binding protein*) y PACT (del inglés *interferon-induced protein kinase*). El mecanismo de acción es muy parecido al del Microprocesador, en el que las proteínas de unión a dsRNA unen el pre-miRNA para que Dicer corte la orquilla dejando también un extremo 3' de 2-3 nts mas largo que el 5' [105]. Aunque en otros organismos Dicer tiene más de una isoforma, en mamíferos sólo existe un tipo y participa tanto en la biogénesis de miRNA como de los siRNAs. El producto de Dicer es un miRNA de doble cadena de las cuales, por lo general sólo una es funcional. La cadena funcional es denominada "guía" y la no funcional "pasajera"[102].

Los miRNAs se acoplan a un complejo de proteínas con funciones efectoras denominadas RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*), compuesto por proteínas de unión a RNA, nucleasas y helicasas [110, 111]. En humanos, la proteína con actividad helicasa es conocida como Gemin y la proteína encargada de unirse al miRNA es AGO [112].

La proteína con mayor relevancia del RISC es la AGO debido a que en ésta se carga la cadena guía del miRNA. Las proteínas argonautas de tipo AGO son las que

participan en la vía de los miRNAs y presentan tres dominios estructurales: a) el dominio PAZ contiene un canal para portar el extremo 3' del miRNA; b) el dominio MID contiene un canal de unión al extremo 5' de los miRNAs, así como un dominio de interacción Cap similar a eIF4E, c) El dominio PIWI tiene una estructura muy similar a RNAsaH. En el humano existen cuatro AGOs, sin embargo, sólo AGO-2 tiene un dominio de corte funcional. De este modo el complejo RISC puede unirse selectivamente a un mRNA blanco por su complementaridad con la cadena guía del miRNA y en su caso, llevar a cabo el corte o la inhibición del mRNA [113, 102, 114, 115].

Los miRNAs de doble cadena en general son estructuras asimétricas, es decir una de las cadenas es favorecida energéticamente para ser incorporada al RISC y la otra cadena queda libre y se degradada [116].

1.2.3. Regulación genética por miRNAs

Por predicción bioinformática se ha estimado que una gran parte del transcriptoma humano esta regulado por los miRNAs. Los primeros estudios de regulación genética demostraron su funcionabilidad al actuar sobre las regiones no traducibles 3' del mRNA; sin embargo, posteriormente se demostró que los miRNAs pueden tener blancos funcionales en cualquier parte del mRNA.

Se estima que entre un 30% a 92% de los genes humanos son regulados por miRNAs dependiendo de los parámetros considerados al realizar las predicciones bioinformáticas [117, 118].

1.2.4. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción inicia con el reconocimiento del miRNA con su sitio de unión en el mRNA actualmente definido como MRE (del inglés *miRNA recognition element*) [119]. En la gran mayoría de las interacciones funcionalmente validadas, una región en el miRNA denominada semilla es la principal responsable de la unión de éste a su blanco. El MRE puede contener una secuencia desapareada denominada burbuja central (que puede medir 2 a 5 nts) y continuar con unión parcial o total al miRNA. Se ha observado que cuando el miRNA contiene una burbuja central que coincide con la burbuja central del MRE la inhibición de la traducción es menos potente [119].

1.2.4.1. Implicaciones de los miRNAs en la traducción.

El mecanismo de acción más conocido para los miRNAs es el de corte específico y degradación del mRNA. En mamíferos esta función es posible sólo cuando el miRNA es montado en el RISC que contiene una AGO-2 y la complementariedad del miRNA con su blanco es extensa incluyendo las posiciones 10 y 11 correspondientes al extremo 5' del miRNA, las cuales se asocian al corte [114, 102]. Un mecanismo distinto de inhibición traduccional, que implica corte endonucleolítico, es la deasilación dirigida, donde el RISC puede acortar la cola de poliA de sus mRNAs blanco [120, 121, 122, 123].

Otro mecanismo de acción asociado a miRNAs es el de represión traduccional sin degradación del mRNA, lo cual requiere la participación de varios miRNAs actuando simultáneamente y una composición específica del RISC [119, 122]. Se ha reportado represión traduccional mediante bloqueo del inicio de la traducción por parte de las proteínas AGO humanas, mediante el dominio MID, utilizando dicho dominio con el

cual podrían competir por la unión al Cap con el factor eIF4E (factor canónico de la traducción) que es uno de los pre-requisitos para la unión del ribosoma al mRNA para iniciar la traducción [124, 115]

Otros autores han reportado que la interacción entre el Cap y el RISC se relaciona con la formación de pseudo-polirribosomas (cadena de ribosomas inactivos) y bloqueo del inicio de la traducción [125]. Por otro lado, se ha sugerido que eIF6, uno de los componentes del RISC, puede interferir de manera secundaria con el ensamblaje ribosomal [126].

También se ha descrito la capacidad de los miRNAs de interferir con la fase de alargamiento durante la traducción del mRNA. Se ha sugerido actividad inhibitoria de los miRNAs en los polirribosomas ya que los mRNAs sujetos a represión mediada por miRNAs pueden estar asociados a polirribosomas[127].

Por último, se ha descrito la compartimentalización celular del mRNA en los cuerpos P ó PBs (del inglés *processing bodies*) mediada por los miRNAs [128, 129]. De este modo, los mRNAs dirigidos a los PBs podrían ser degradados aunque se ha reportado que algunos mRNAs confinados en los PBs podrían ser liberados al citoplasma y reactivar su traducción. Un ejemplo de este sistema es el reportado por Bhattacharyya y cols [130], donde el miRNA-122 inhibe el mRNA del transportador catiónico de aminoácidos 1 y lo confina en los PBs. Posteriormente, el estrés celular permite la liberación y traducción de este mensajero debido a su interacción con una proteína de unión a secuencias ricas en elementos AU en la 3'UTR (AREs) [130]. Aunque la represión traduccional puede llevarse a cabo sin la participación de los PBs, su papel en este tipo de vías puede ser importante en procesos complejos. La represión traduccional en general no afecta el nivel del mRNA, aunque se ha reportado

que se produce un poco de degradación [129].

1.2.4.2. Aumento de la actividad traduccional

En general los miRNAs modulan la expresión genética mediante la inhibición traduccional, sin embargo se ha reportado que también pueden incrementar la actividad traduccional. En este sentido, se ha reportado que la replicación de HCV es estimulada por el miRNA-122 mediante un mecanismo de aumento en la traducción de las proteínas virales, al favorecer la asociación de los ribosomas con el RNA viral en etapas tempranas de la infección. Este aumento en la actividad traduccional es independiente de la síntesis de RNA viral [131, 132].

La activación traduccional es una función frecuente de los miRNAs durante el arresto del ciclo celular y el mecanismo que se sugiere para este evento se relaciona con las regiones AREs inmersas en la 3'UTR de ciertos mRNAs. Se ha demostrado que algunos miRNAs como el miRNA-369-3p y Let-7 se unen directamente a los AREs de determinados mensajeros produciendo activación traduccional en situaciones de arresto del ciclo celular, mecanismo dependiente de la interacción de AGO-2 con la proteína de unión al ARE llamado FXR1 (del inglés *fragile X mental retardation related protein*) [133, 134].

1.2.4.3. Regulación Transcripcional

Activación transcripcional. Los miRNAs también pueden tener funciones a nivel de la transcripción, por ejemplo la activación de la transcripción de las proteínas E-caherina y de la proteína de choque frío CSDC2 es inducida por la interacción del miRNA-373 a las secuencias promotoras de dichas proteínas. La activación transcripcional por miRNAs puede estar relacionada con el reclutamiento de la RNA

Polimerasa II aunque el mecanismo aun no ha sido dilucidado [135].

Inhibición transcripcional. La inhibición transcripcional mediada por miRNAs en células de mamífero se ha reportado para el gen POLR3D; esta inhibición ocurre cuando el miRNA-320 interacciona con la cadena antisentido de su promotor, al cual se unen también las proteínas AGO-1, PcG-EZH2 y H3K27. Debido a que otros promotores pueden contener MERs funcionales, estos mismos autores contemplan la posibilidad de que alrededor de 1,200 genes puedan ser regulados de este modo [136].

Además, otros autores han reportado la inhibición de la transcripción de ciertos genes (como EF1A) por interacción directa de siRNAs con los promotores de diversos genes en distintos organismos incluidos los humanos. El resultado de dicha regulación es el cambio en el patrón de metilación del DNA que se traduce en cambios de estado en la cromatina. Se ha propuesto que este tipo de inhibición sólo pueda darse en genes transcripcionalmente activos en los que las cadenas de DNA del promotor están separadas [137, 138, 139].

1.2.5. Identificación de miRNAs

La combinación de ensayos experimentales con computacionales han derivado en la identificación de cientos de miRNAs en múltiples genomas, entre ellos animales y plantas [140]. A la fecha se han descrito ~ 700 miRNAs en humanos y se especula que aún faltan algunos por descubrirse, ya que en el genoma existen muchas secuencias que pueden plegarse en estructuras secundarias tallo-burbuja, parecidas a las estructuras de los pre-miRNA [141].

Una de las particularidades de los MREs o blancos funcionales para miRNAs es que es indispensable una complementaridad absoluta de los nucleótidos 2-8 del miRNA con su blanco, denominada también región semilla. Sin embargo, la probabilidad de

que el complemento de una secuencia semilla determinada aparezca por azar es muy alta¹ por lo que análisis de este tipo arrojan una gran cantidad de blancos posibles de miRNAs que en realidad no tienen función biológica.

Por lo anterior, se han desarrollado métodos que toman en cuenta otro tipo de variables, como son la composición de nucleótidos que flanquean a la region semilla, la energía con la que se uniría ésta a su blanco, o parámetros evolutivos. En cuanto a los parámetros evolutivos, se considera el grado de conservación de los blancos, actualmente se esta incluyendo una calificación que toma en cuenta relaciones filogenéticas de blancos conservados entre especies y su presión de selección. Últimamente, se ha propuesto considerar como blancos funcionales aquellos que se conservan subsecuente en diferentes nodos de una red metabólica [142].

A la fecha se han desarrollado varios programas para predecir los blancos de miRNAs. Algunos ejemplos de estos son Pictar, miRanda, DIANA-microT, TargetScan, HumiTar, MiRTif, etc. Dichos programas emplean una serie de reglas similar considerando entre otros parámetros: que contenga la región semilla, que el blanco se encuentre en la 3'UTR del gen blanco, que exceda un punto de corte de energía libre de hibridación y que el blanco se encuentre conservado en diferentes especies [143, 144, 145, 119, 146, 117, 147, 148].

¹La probabilidad de encontrar una secuencia continua de 8 nucleótidos al azar en las cadenas de DNA es de $0,25^8$ es decir, puede repetirse cada 4^8 bases.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. MicroRNAs y Regulación del ciclo de replicación viral

Los reportes sobre la participación de la maquinaria del RNA de interferencia en nemátodos y plantas hacia suponer que los miRNAs tendrían un efecto inhibitorio sobre las infecciones virales. Actualmente, ha sido demostrada la capacidad por parte de los miRNAs de favorecer o reprimir, de manera directa o indirecta el ciclo de replicación viral; así mismo, los virus cuyo genoma esté compuesto por DNA en alguna etapa de la infección pueden codificar miRNAs (v-miRNAs) funcionales capaces de regular directa e indirectamente su ciclo de replicación.

2.1.1. Virus de la Hepatitis C y miRNA-122

En el 2006 Jopling observó que la inhibición del miRNA-122, mediante oligonucleótidos antisentido, ocasionaba una disminución drástica de los niveles de RNA del HCV cuando se propagaba en células hepáticas [132]. En observaciones subsecuentes pudo determinarse un blanco para el miRNA-122 ubicado en la región 5'UTR del

HCV y la mutación de dicha secuencia también disminuía la cantidad de copias del RNA viral [132]. Posteriormente se describió una interacción intragenómica entre las regiones 5'UTR y codificante de HCV que desfavorecía la replicación. Cuando se producía la interacción con su blanco en la 5'UTR se favorecía una apertura genómica y quedaba libre una entrada alternativa para que el ribosoma pudiera iniciar la traducción [149]. Más tarde, se demostró que el silenciamiento de proteínas de los complejos de procesamiento de miRNAs perjudicaba la replicación del genoma de HCV [98]. Además, el IFN β era capaz de inducir la expresión de miRNAs que fueron capaces de disminuir la replicación de HCV y la expresión de miRNA-122 [150].

En conjunto, la evidencia señala que este virus puede ser favorecido por un estado basal del metabolismo hepático, sujeto a un gran estrés oxidativo en el que el miRNA-122 juega un papel importante; sin embargo las células pueden responder con ayuda de señales como el IFN β y de antealimentación para tratar de contrarrestar tanto la infección como el daño oxidativo [150, 151]. Por otro lado, Chang y Guo reportaron que el miRNA-122 puede potenciar la replicación del HCV en células embrionarias del epitelio renal (HEK-293) al ser administrado exógenamente, y aunque miRNA-122 no es indispensable promueve enormemente la replicación de HCV [152].

2.1.2. Otros miRNAs endógenos y exógenos pueden regular la replicación de virus

En células de riñón de hámster se demostró que la replicación del virus espumoso de primate tipo 1 (PFV-1) era limitada debido a la presencia del miRNA-32, el cual inhibe la traducción de los mensajeros virales. Se demostró que PFV-1 codifica una proteína responsable de secuestrar a miRNA-32 y favorecer su ciclo replicativo [97].

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) puede suprimir la expresión de un agrupamiento de miRNAs conocido como miRNA-17/92 el cual interfiere indirectamente en su ciclo de replicación [153]. TRBP es una proteína que forma parte de los complejos Microprocesador y RISC siendo necesaria para su correcta función. Se ha demostrado que la secuencia TAR del RNA de HIV puede secuestrar a TRBP e inhibir parcialmente la vía de los miRNAs [154]. Así mismo, el elemento TAR es procesado por la enzima Dicer para crear un miRNA viral que puede estar involucrado el proceso de latencia viral [155].

Por su parte el *Poliomavirus* SV40 (del inglés *simian virus*) contiene v-miRNAs que regulan su ciclo replicativo los cuales se acumulan en la fase tardía de la infección y degradan los mRNAs virales de la etapa temprana que disminuyen la expresión de antígenos T sin afectar la eficiencia de replicación. Esto es importante, puesto que los antígenos T pueden ser detectados por el sistema inmunológico e iniciar una mayor respuesta citotóxica [99]. Más tarde se descubrió que los *Poliomavirus* conservan este mecanismo de regulación [156].

Por predicción bioinformática y ensayos experimentales se ha reportado que existen otros virus de DNA que codifican v-miRNAs como el virus de Epstein-Barr, virus herpes asociado a Sarcoma de Kaposi, virus gama-herpes de roedor, citomegalovirus y herpes simple 1 [157, 158].

Por último, se ha reportado la participación indirecta de la vía de los miRNAs sobre el ciclo replicativo viral como en el caso de el virus de la influenza A (IV-A) donde sin haber identificado un miRNA regulador, se ha demostrado que Dicer tiene un efecto inhibitorio sobre la replicación del IV-A y que las etapas tardías de la infección con IV-A correlacionan con la disminución de Dicer a nivel del mRNA y de

proteína [159].

2.2. Importancia del Estudio

Con lo descrito anteriormente se demuestra ampliamente la relación funcional que los miRNAs pueden tener en el ciclo de replicación de los virus en el hospedero además de sus funciones en una gran diversidad de procesos celulares. De tal manera que el estado basal de la expresión de los miRNAs podría ser en parte responsable de la susceptibilidad a la infección.

Por otro lado, se puede considerar que la divergencia genética entre serotipos del DENV que ha sido relacionada con una virulencia diferencial, se correlacione con una interacción diferencial con diversos miRNAs que sean capaces de modular el ciclo replicativo viral. Dentro del ciclo de replicación del DENV se ha demostrado que la 3'UTR es indispensable, sin embargo, a la fecha no se ha reportado si existe alguna interacción entre los miRNAs del hospedero con esta región del genoma viral y de ser así, las implicaciones que tendría en el ciclo replicativo [28].

De este modo, una mejor comprensión de las relaciones huésped-parásito y en particular la que se refiere a los miRNAs con DENV, podrían explicar en parte la propensión a desarrollar cuadros de menor o mayor gravedad dependiendo del nivel de expresión de los miRNAs que favorecen o inhiben la multiplicación viral. Lo anterior permitiría desarrollar alternativas de tratamiento contra el DENV.

Capítulo 3

Hipótesis

Tomando en cuenta la importancia descrita de los miRNA como posibles reguladores del ciclo replicativo viral, y su unión a la 3'UTR de los mRNAs, se plantea la siguiente hipótesis:

- El miRNA-199b inhibe la replicación del DENV-4 al interactuar directamente con la CS de la 3'UTR del genoma viral.

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo General

- Determinar el papel del miRNA-199b en el ciclo replicativo del DENV-4.

4.2. Objetivos particulares

1. Cuantificar la expresión del miRNA-199b en macrófagos infectados y no infectados con DENV-4.
2. Determinar el efecto de los mimetizadores del miRNA-199b en la eficiencia replicativa del DENV-4.
3. Determinar el efecto de los inhibidores del miRNA-199b en la eficiencia replicativa del DENV-4.

Capítulo 5

Materiales y Métodos

5.1. Estrategia Experimental

En primer lugar, se buscaron los miRNAs que *in silico* tuvieran una interacción específicamente con la 3'UTR de DENV-4. El miRNA con el que se llevó a cabo el presente trabajo se seleccionó debido a que poseía una posible secuencia blanco en la 3'CS, además de que dicha secuencia se conserva en los DENV. Una vez seleccionado el miRNA, se procedió a evaluar su expresión en condiciones basales y de infección a diferentes intervalos de tiempo por la técnica de cuantificación mediante RT-PCR en tiempo real. Por último, se analizó su efecto general sobre la replicación de DENV-4 mediante la transfección de mimetizadores e inhibidores del miRNA estudiado (Figura 5.1).

5.1.1. Determinación del miRNA candidato

Para determinar cuál sería el miRNA de trabajo se utilizó la siguiente metodología. En primer lugar, se usó la programa ViTA para identificar los miRNAs humanos que potencialmente tendrían uno o mas MREs en la 3'UTR de DENV-4. El análisis se

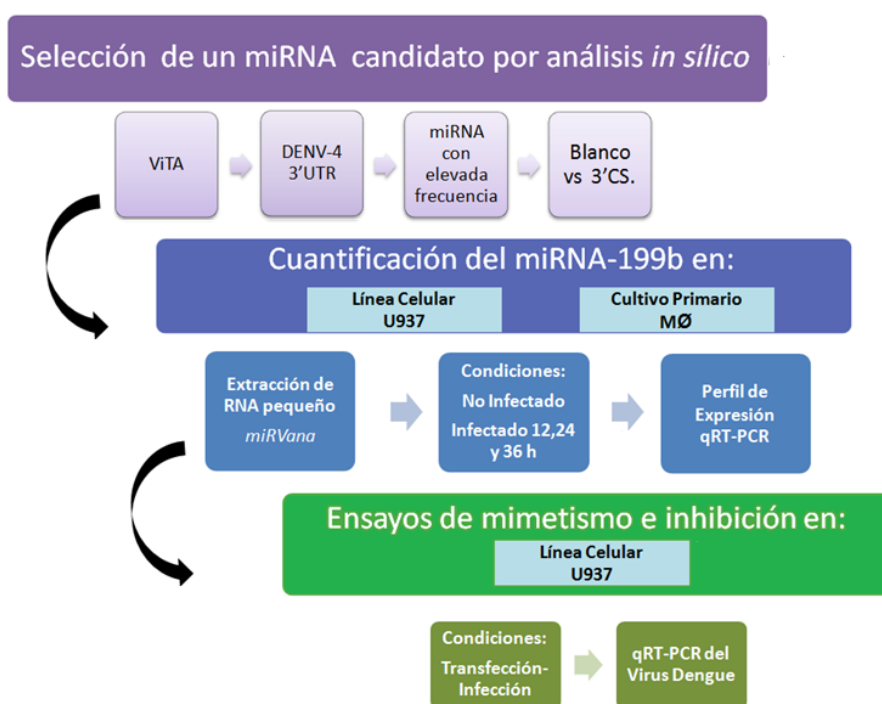


Figura 5.1: Estrategia Experimental General

realizó en 6 secuencias genómicas de DENV-4 completas disponibles hasta el momento en ViTA. Después se analizó la frecuencia con la que éstos microRNAs aparecían en los 6 genotipos. Los miRNAs que presentaron la mayor frecuencia se evaluaron el programa MirTif caracterizado por su capacidad de depurar MREs falsos como se describe mas adelante en la sección de resultados [160, 28, 148].

5.1.2. Cuantificación de la expresión del miRNA-199b macrófagos no infectados e infectados con DENV-4.

5.1.2.1. Aislamiento de monocitos para la obtención de cultivo primario de macrófagos humanos.

Los cultivos primarios de monocitos-macrófagos humanos fueron aislados a partir del concentrado leucitario (*Buffy Coat*) extraídos de donadores masculinos sanos en el banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI. A cada paquete sanguíneo se le añadió un volumen igual de PBS (10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄ (pH 7.3), 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl) estéril, se homogenizó suavemente y se agregó en partes iguales a tubos falcon con 10 ml de Ficoll. Se centrifugó a 2,200 rpm por 25 min. Se colectó la fase intermedia (leucocitaria) y se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionó PBS a la pastilla, se homogenizó y tomó una alícuota para el recuento en la cámara de Neubauer. Se resuspendió en buffer de columna (PBS-EDTA 5 mM-SFB 0.005 %) y se homogenizó, se adicionó 20 μ l de perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-CD14 y se incubó a 4°C por 15 min. Se adicionó buffer de columna y se centrifugó a 1,200 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y se adicionó buffer de columna. Para recuperar las células CD14+, se adicionó a la columna un volumen de 1 ml de la siguiente

manera: buffer de columna, muestra, buffer de columna y PBS-SFB 0.005 % frío. Los monocitos obtenidos se cultivaron con medio RPMI 1640 Advanced (Gibco-BRL) suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, 10 % de suero fetal bovino certificado (SFB), penicilina estreptomycin (Gibco) y 2 mM de L-glutamina (pH=7) [161, 162].

5.1.2.2. Cultivo de células U937 diferenciadas

Las células U937 fueron mantenidas en cultivo de suspensión con RPMI-1640 (Gibco-BRL) suplementado con SFB al 10 % (Gibco), 2 mM L-glutamina y 10 mM HEPES en ambiente húmedo a una temperatura de 37°C con CO_2 al 5 %. Las células U937 fueron inducidas a diferenciarse mediante la exposición a 5ng/ml de acetato mirístico de forbol (PMA) por 48 h [163].

5.1.2.3. Infección de los cultivos celulares con DENV-4.

Las células del cultivo primario de macrófagos o las células U937 se infectaron con virus DENV-4 a una MOI de 1 por 2 h a 37°C, CO_2 al 5 %. Después de retirar el virus, las células se lavaron con medio fresco y se deja progresar la infección por 12, 24 y 36 h antes de realizar la extracción de los RNAs [164].

5.1.2.4. Extracción de los miRNAs a partir de los cultivos celulares.

Para la extracción de los miRNAs se utilizó el sistema *mirVana isolation kit* (Ambion) que está optimizado para la obtención la fracción correspondiente a RNAs pequeños en donde se encuentran los miRNAs. Los cultivos celulares fueron sembrados en multiplacas de 12 pozos con una densidad de 8×10^5 células por pozo. Las células

tratadas en cada una de las condiciones de infección se rompen en 600 μ L de solución de lisis, la cual estabiliza el RNA e inactiva a las RNAsas. El lisado se recoge en un tubo nuevo y se le agregó 60 μ L del aditivo de homogenización, se mezcla y se incuba por 10 min en hielo. Posteriormente el lisado se somete a una extracción con fenol ácido:cloroformo, para remover la mayoría de los componentes celulares y el DNA, dejando un RNA semipuro, el cual se encuentra en la fase acuosa. Posteriormente se adiciona 600 μ L de fenol ácido: cloroformo y se mezcló en vortex por 1 min. Se centrifugó 10 min a 10,000g a temperatura ambiente, se tomó la fase acuosa la cual se hizo pasar por una membrana de sílice, se centrifuga a 10,000 rpm por 15 s, la fracción eluída contenía a los miRNAs. El volumen eluído se trató con 2/3 de etanol al 100 %, se mezcló y se pasó por una segunda columna centrifugando en las mismas condiciones. Se realizó un lavado con 700 μ L de solución de lavado 1, se centrifugó a 10,000g y luego se hicieron dos lavados similares de 500 μ L con solución de lavado 2/3. Los miRNAs pequeños se eluyeron de la columna aplicando 100 μ L de agua libre de nucleasas precalentada a 95°C, se centrifuga a 10,000g por 30 s. Por último se colectó la elución y se guardó a -70°C. El RNA total del lisado de las células tratadas se utilizó para la detección del genoma viral mediante RT-PCR en punto final corroborar la infección de las células tratadas. También fue posible realizar los ensayos de expresión de miRNAs a partir de RNA total extraído con TRIzol [165, 166, 167].

Para analizar la cantidad y calidad de los RNAs pequeños colectados se separaron 10 μ L de la muestra eluída en un gel de agarosa al 2 % por 15 min para verificar la banda correspondiente a los RNAs pequeños. La cuantificación se realizó mediante el registro de los pixeles obtenidos en cada banda con la ayuda del fotodocumentador Fuji FLA-5100 comparados con marcadores de tamaño molecular cuantificados (Fermentas).

5.1.3. Cuantificación del miRNA-199b por RT-PCR en Tiempo Real.

Después de la extracción de los miRNAs en cada uno de los cultivos en las diferentes condiciones, se llevó a cabo la cuantificación de los miRNAs de interés por RT-PCR en Tiempo Real [168, 169, 170]. La cuantificación de los miRNAs se realizó con *mirVana qRT-PCR miRNA Detection Kit* (Ambion), utilizado para la transcripción reversa y PCR cuantitativa que permite la detección de la expresión de los miRNAs a partir de los miRNAs purificados. Debido al corto tamaño de los miRNAs, se utilizaron los iniciadores recomendados por el sistema que contienen una secuencia adicional y nucleótidos modificados, permitiendo identificar un producto muy específico de aproximadamente 90 pb (Figura 5.2). Como control se diseñaron iniciadores para la amplificación de RNA ribosomal 5S (5S rRNA) (Cuadro 5.1). Para este fin se utilizó el programa Primer Express® v3.0 y se seleccionó un par de iniciadores con características de amplificación similares a las utilizadas para la detección del miRNA-199b como el tamaño y una temperatura de alineamiento de 60°C. Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, se mezclaron 20 ng de RNA pequeño o 200 ng de RNA total, 2 μ l de Buffer de RT *mirVana* 5X, 1 μ l 1X del iniciador para RT diseñado específicamente para el miRNA-199b ó 200nM volumen final del iniciador antisentido del gen 5S rRNA, 0.4 μ l de la enzima ArrayScript y agua libre de nucleasa para llevar a 10 μ l de volumen total. La mezcla se incubó por 30 min a 37°C y posteriormente por 10 min a 95°C para inactivar la enzima de RT. Los cDNAs obtenidos en la reacción de retrotranscripción se mezclaron con 5 μ l de Buffer de PCR *mirVana* 5X (contiene dNTPs y MgCl₂), 1U de SuperTaq (Ambion), 0.5 μ l 1X de iniciadores de PCR *mirVana* específicos para el miRNA-199b ó 200 nM a concentración final de la

mezcla de iniciadores para PCR del gen utilizado como control. Finalmente se agregó Evagreen 1X (Biotium) a concentración final y la reacción se completó con agua libre de nucleasa para un volumen final de 25 μ l. La reacción se cargó en placas de 96 pozos por duplicado para cada una de las condiciones de estudio. Las condiciones de PCR utilizadas son un ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 min y 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 30 seg en el equipo de PCR en tiempo real Abi-Prism 7300. La cantidad de miRNAs expresados en cada una de las condiciones se determinó mediante el método de CT (Cycle Threshold), ya que este es un parámetro que se toma como medida relativa de la cantidad de templado que se encuentra inicialmente en cada reacción [165].

Cuadro 5.1: Iniciadores evaluados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real en la detección del miRNA-199b

Gen	Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto
miRNA-199b	Sentido	Protegida	~90pb
miRNA-199b	Antisentido	Protegida	
5S rRNA	Sentido	TACGGCCATACCACCCTGAAC	90pb
5S rRNA	Antisentido	GCGGTCTCCCATCCAAGTACTAA	

5.1.4. Transfección de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-199b en las células U937.

La transfección de los cultivos celulares con mimetizadores e inhibidores del miRNA-199b se realizó por el método de lipotransfección con el reactivo *SiPortT Amine* (Ambion). Las células utilizadas para este propósito se mantuvieron en ausencia de

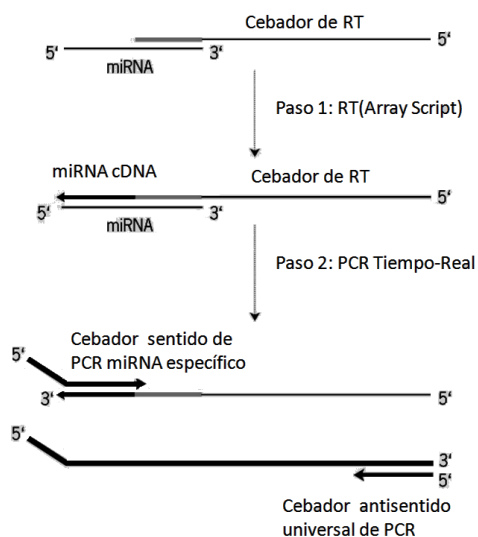


Figura 5.2: **Esquema de la detección de los iniciadores del miRNA-199b.** Los iniciadores utilizados tienen la ventaja de que generan de ~ 90 pb del miRNA específico. Durante la transcripción reversa, la secuencia adicional agregada al iniciador adquiere una estructura tallo burbuja permitiendo a la secuencia específica del iniciador interactuar con su molde evitando hibridaciones inespecíficas. La estructura secundaria de este iniciador sólo permite la interacción con templados pequeños, haciéndola ideal para la detección de miRNAs maduros. Comunicación personal con el servicio de soporte técnico de Applied Biosystems.

antibióticos al menos 24 h antes de la transfección. La mezcla de transfección se realizó de la siguiente manera: 1.5 μl de SiPort se incubaron con medio de transfección por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se mezclaron con 50 nM de mimetizador o inhibidor del miRNA-199b concentración final así como 50 nM concentración final del miRNA acoplado a CY3 utilizado como control (sin blanco en células de mamífero) y medio de cultivo para ajustar a 50 μl . Después de 15 min de incubación se agregó la mezcla de transfección con 200 μl de medio de cultivo sin antibióticos a la monocapa de células. Se sembraron 1.5×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos. Las células se infectaron 24 h postransfección en las condiciones descritas y se analizaron tanto el sobrenadante como los extractos de RNA para la detección del nivel de infección viral por RT-PCR en tiempo real [171, 165].

5.1.5. Extracción de RNA total de los cultivos celulares.

Para extraer el RNA de los cultivos celulares se utilizó TRIzol para lo cual en primer lugar se retiró el medio de cultivo de la placa que contiene la monocapa de células y se lavó con PBS. Posteriormente se adicionaron 400 μl de TRIzol por pozo para placa de 12 pozos, se homogenizó con pipeteo y se dejó interaccionar por 5 min, posteriormente se añadieron 80 μl de cloroformo y se mezcló e incubó por 2 a 3 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar las muestras a 12,000g por 15 min se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadieron 200 μl de isopropanol. Esta mezcla se incubó durante 10 min y se centrifugó a 12,000g por 10 min a 4°C. La pastilla obtenida se lavó con 400 μl de etanol al 75 % y se centrifugó a 7,500g por 5 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a -70°C hasta su uso [172, 167].

5.1.6. Determinación de la eficiencia de la replicación viral.

5.1.6.1. Cuantificación de RNA viral por RT-PCR en Tiempo Real.

Los iniciadores que se utilizaron en esta técnica amplificaron una región de la proteína no estructural NS5 del genoma del virus del dengue reportada previamente (Cuadro 5.2) [169, 170]. Para normalizar los valores de la amplificación del genoma viral se probaron iniciadores de tres genes constitutivos: Ciclofilina A (PPI-A) , RNA ribosomal 18 S (18S rRNA) e Hipoxantina fosforibosil transferasa 1 (HPRT1) siendo este último el par de iniciadores con el que se trabajó. Para PPI-A se utilizaron iniciadores previamente reportados por Islam y Mendenson [173]; para HPRT1 y 18S rRNA los iniciadores se diseñaron a partir de la secuencia reportada en NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Cuadro ??); para lo que se empleó el programa Primer Express v3® calibrado para buscar pares de iniciadores para RT-PCR en tiempo real con aproximadamente 110pb de producto así como una Tm de 60°C (ver cuadro 5.2).

Cuadro 5.2: Iniciadores utilizados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real para la detección de DENV-4

Gen	iniciador	Secuencia	Tamaño del producto
DENV	Sentido	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	264pb
DENV	Antisentido	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	
HPRT1	Sentido	GATGGTCAAGGTCGCAAGCTT	114pb
HPRT1	Antisentido	GTCAAGGGCATATCCTACAACAAACTT	
PPI-A	Sentido	TTTCATCTGCACTGCCAAGACT	110pb
PPI-A	Antisentido	CCATTCCTGGACCCAAAGC	
18S rRNA	Sentido	ATACCGCAGCTAGGAATAATGGAATAG	109pb
18S rRNA	Antisentido	CTAGCGGCGCAATACGAATG	

La reacción de retrotranscripción se realizó con la enzima Improm II (Promega)

de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante. Brevemente, se mezclaron 500ng de RNA total con 200 nM concentración final del iniciador antisentido específico y agua libre de nucleasas para completar 5 μ l y se incubaron a 70°C por 5 min. Posteriormente la mezcla se pasó a hielo por 5 min para después añadir 4 μ l Buffer RT Improm II 5X, 1 μ l de enzima RT Improm II así como 500 μ M de la mezcla de dNTPs y 3 mM de MgCl₂ concentración final completado con agua libre de nucleasa para llevar a volumen final de 20 μ l. Se incubó por 60 min a 37°C y posteriormente a 70°C por 15 min. El producto obtenido se almacenó a -20°C o se usó inmediatamente en la reacción de PCR [174].

La reacción de PCR se realizó con 5 μ l del cDNA obtenido en la reacción anterior con concentración final de 200 nM de la mezcla de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 200 μ M de mezcla de iniciadores de PCR y Eva Green 1X (Biotium) así como 2.5 μ l Buffer de PCR 10X y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y agua ultrapura para completar 25 μ l. Los ciclos de PCR realizados para detectar DENV-4 y HPRT1 se programaron como sigue: 1 ciclo de 95°C 5 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg, 72°C durante 30 seg, seguido de una etapa de disociación diseñada de manera estándar por el equipo de tiempo real antes mencionado [167].

5.1.6.2. Ensayos de titulación viral por plaqueo.

Con la finalidad de determinar la cantidad de virus por unidad de volumen se realizaron ensayos de plaqueo que consistieron en realizar diluciones seriales a partir del extracto de cerebro de ratones infectados o de los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados e incubar cada dilución por duplicado en monocapas de células BHK-21 sembradas en placas de 24 pozos. Después de 2 h de incubación, se agrega

carboximetilcelulosa al 1.5 % para evitar una posterior difusión viral. Después de 4 días de incubación a 37°C 5% y de CO_2 se contó el número de placas formadas revelando con azul de bromonaftol. Las placas observadas en cada dilución viral nos permite calcular las unidades formadoras de placa por mililitro (PFUs/ml). Cada PFU es equivalente a una partícula viral infectante [175, 176, 164].

Capítulo 6

Resultados

6.1. Selección de un miRNA candidato

Los miRNAs son muy importantes en la regulación de la expresión genética de un gran número de mRNAs celulares, sin embargo, también se ha demostrado que dichas moléculas tienen un papel en la modulación del ciclo replicativo de los virus, es por ello que el propósito de este trabajo se centró en determinar a los miRNAs que tienen como secuencia blanco el genoma del DENV. La región en la que se enfocó este estudio es la 3'UTR ya que diversos estudios han mostrado que esa región contiene secuencias reguladoras importantes para la replicación del DENV.

Con este propósito, se utilizó el programa ViTA que tiene la finalidad de buscar blancos de los miRNAs del hospedero en genomas virales de interés, para lo cual se alimenta de bases de datos y otros programas como TargetScan y Miranda. Después de realizar la búsqueda, ViTA emite un reporte donde enlista los miRNAs con la correspondiente secuencia viral blanco, así como la energía de interacción [160, 177, 143].

El resultado de esta búsqueda indicó que 181 miRNAs tienen al menos un probable

MER a lo largo del genoma del virus. Alineando las secuencias de los MERs en 6 genotipos de DENV-4, se observó que de los 45 miRNAs con blancos que tienen MERs en la 3'UTR de DENV-4 sólo 11 tenían MERs conservados y el resultado de dicho análisis puede observarse en los cuadros 6.1y 6.2.

Cuadro 6.1: Determinación con el programa ViTa de miRNAs con MREs en DENV-4

miRNAs con MERs en el DENV-4	miRNAs con MERs en 3'UTR del DENV-4	miRNAs con MERs conservados en 3'UTR del DENV-4
181	45	11

Al agrupar a este subcategoría de 11 miRNAs, se observó que varios de ellos compartían el mismo MER, excepto en el caso de uno de los blancos del miRNA-326 y del miRNA-16 (Cuadro 6.2). El MER de los miRNAs 199a, 199b, 337, y 338 que corresponde con la 3'CS del genoma viral fue seleccionado tanto por su importancia en el ciclo replicativo viral como por su elevado grado de identidad entre los distintos serotipos de DENV [145, 28, 33].

Aunque el resultado anterior indica que la posible función por parte de los miRNAs sobre la 3'CS pueda ser cooperativa, en el presente proyecto se eligió trabajar con el miRNA-199b. Lo anterior debido a que se ha reportado que la expresión del miRNA-199b es mayor que alguna de los otros tres miRNAs tanto en monocitos CD-14⁺ como en células dendríticas¹, cultivos muy parecidos a los utilizados en esta investigación [178].

Para contar con una validación bioinformática adicional se sometió la interacción

¹Células dendríticas tanto estimuladas como no estimuladas.

Cuadro 6.2: miRNAs con blanco en la 3'UTR de DENV-4.

Nombre del miRNA	MRE en secuencia del DENV-4	Mínima Energía Libre kcal/mol	Porcentaje de Identidad del MER en DENV-4	Porcentaje de Identidad del MER en DENV
miRNA-199b	10557 - 10577	-17.8	100 %	95 %
miRNA-199a	10557 - 10577	-19.1		
miRNA-338	10556 - 10577	-18.1		
miRNA-337	10555 - 10577	-14		
miRNA-326	10514 - 10532	-27.4	100 %	60 %
miRNA-516-3p	10478 - 10498	-15.2	86 %	36.3
miRNA-149	10478 - 10499	-20.2		
miRNA-296	10472 - 10491	-19.96	80 %	60 %
miRNA-326	10370 - 10393	-18.64	88 %	48 %
miRNA-331	10370 - 10394	-16.9		
miRNA-324-5p	10360 - 10378	-17.1		
miRNA-16	10325 - 10353	-18.7	96 %	62 %

del miRNA con la 3'CS de DENV-4 al programa MirTif, el cual basa la predicción de las interacciones en la información obtenida de blancos que han sido probados experimentalmente como positivos ó negativos y asigna una calificación [148]. El resultado positivo significa implica la probabilidad alta de que la interacción predicha sea verdadera y mientras más elevado sea el valor positivo mayor será la probabilidad de una interacción verdadera. Al evaluar la interacción de miRNA-199b con la región 3'CS el valor fue de 1.27 por lo tanto es catalogada como verdadera.

6.2. Expresión del miRNA-199b en cultivo primario de macrófagos y en la línea celular U937

El primer paso para definir el papel del miRNA-199b en el ciclo de replicación viral es determinar su expresión en las células a estudiar. La detección y la cuantificación relativa del miRNA-199b se llevo a cabo mediante RT-PCR en tiempo real. Como

control de carga diseñaron iniciadores para la amplificación del gen constitutivo 5S, rRNA gen comúnmente utilizado para normalizar este tipo de ensayos [179, 180, 181]. Después de realizar una RT-PCR en punto final utilizando ambos pares de iniciadores se observó un producto de 90 pb conforme a lo esperado corroborándose la capacidad de detección de ambos genes (Figura 6.1).

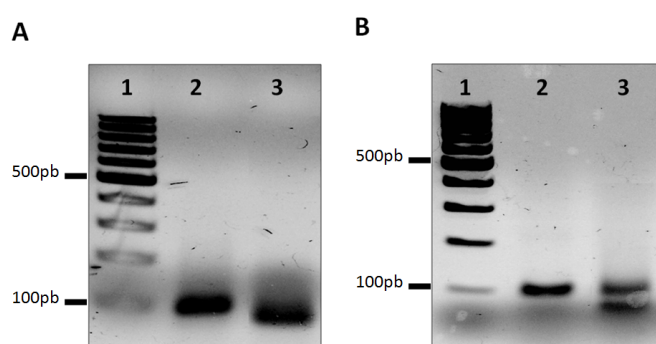


Figura 6.1: RT-PCR de punto final para amplificar miRNA-199b y 5S rRNA. El extracto de miRNAs obtenido de células U937 diferenciadas se utilizó para la amplificación del miRNA-199b (panel A) y del 5S rRNA (panel B), obteniendo un producto de ~90pb que se separó en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1 y 3 de los paneles A y B se separaron marcadores de tamaño molecular (100pb) y el control negativo de transcriptasa reversa respectivamente.

Para determinar si el miRNA-199b se expresa en macrófagos de cultivo primario y de la línea celular U937 y se realizó una RT-PCR en tiempo real. Los niveles de expresión del miRNA-199b se reportan como Ct que corresponde al ciclo en el que la amplificación del gen en estudio es detectado durante la PCR. En los macrófagos de cultivo primario la expresión del miRNA-199b fue muy variable en las células de tres individuos distintos, como se ve reflejado por los valores de Cts que variaron entre 17 y 31 (Figura 6.2), lo anterior puede deberse entre otras cosas al fondo genético y al estado nutricional del individuo.

En el caso del cultivo de células U937 los niveles de miRNA-199b fueron consistentes presentando una Ct media de 24 (Figura 6.2), mientras que las del 5S rRNA fue de 9, determinándose que la expresión del miRNA-199b en condiciones basales es muy baja comparada con la del 5S rRNA (2^{15} veces menor ¹).

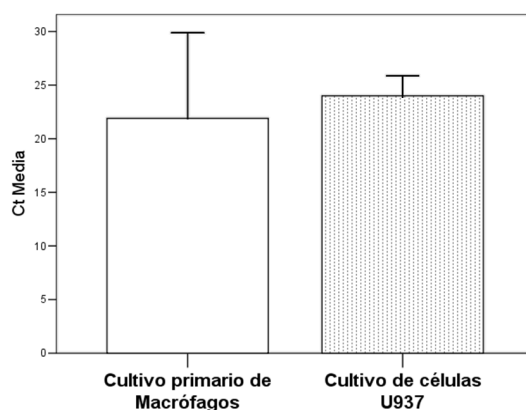


Figura 6.2: Determinación de los niveles de expresión basal del miRNA-199b en cultivo primario de macrófagos y en la línea celular U937. El RNA de macrófagos de cultivo primario o de células U937 fue utilizado como templado para amplificar el miRNA-199b mediante RT-PCR en tiempo real, los datos se normalizaron con respecto a la amplificación del RNA ribosomal 5S. En el eje Y se muestra el nivel de expresión del miRNA-199b expresado en Ct y en el eje X los cultivos celulares donde fue evaluada. Las barras en cada una de las columnas representa la desviación estándar de los valores obtenidos al realizar el experimento por triplicado con dos repeticiones.

¹Debido a que con cada ronda de PCR el templado se duplica, la detección a ciclos menores implica mayor expresión de un gen comparada con la detección en los ciclos finales.

6.3. Perfil de expresión del miRNA-199b durante la infección con DENV-4 en cultivo primario de macrófagos y en la línea celular U937.

Para determinar si el nivel de expresión del miRNA-199b variaba durante la infección con DENV-4 se llevó a cabo una cinética de infección de 12, 24 y 36 h. En cada uno de los tiempos, se cuantificó la expresión del miRNA-199b normalizada con los niveles de expresión del 5S rRNA y se comparó con los niveles basales de cultivo no infectado; en cada condición se corroboró la ausencia o presencia de infección del DENV por RT-PCR punto final.

En el caso del cultivo primario de macrófagos, no se encuentran cambios significativos en el nivel de expresión del miRNA-199b en la cinética de infección, el cual fue muy variable como puede observarse en la figura 6.3 y en el cuadro 6.3 donde se resumen los resultados del experimento realizado por triplicado a partir del extracto del RNA del cultivo primario de macrófagos de tres donadores diferentes. Los resultados obtenidos son congruentes con las variaciones en el nivel del miRNA-199b en dichas células no infectadas pues estas variaciones también se observan en la cinética de infección, lo cual resulta en la ausencia de diferencias significativas en el nivel del miRNA entre células infectadas con respecto a las no infectadas.

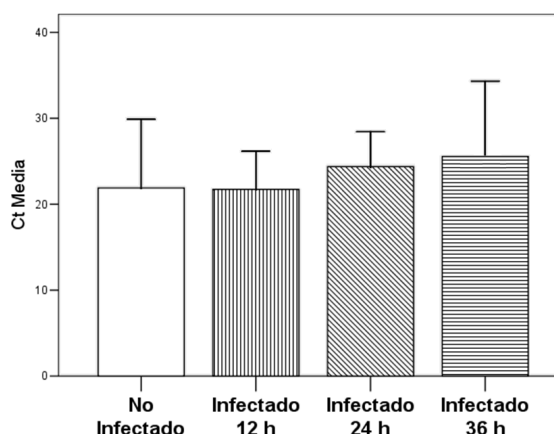


Figura 6.3: **Perfil de expresión del miRNA-199b en cultivo primario de macrófagos durante una cinética de infección con DENV-4.** El RNA de los cultivos primarios de macrófagos infectados con DENV-4 a una MOI de 1 por 12, 24, 36 h se utilizó para llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real en la que se amplificó el miRNA-199b. El nivel de expresión del miRNA se normalizó con respecto a la amplificación del 5S rRNA. En el eje Y se muestra el nivel de expresión del miRNA-199b expresado en Ct y en el eje X las diferentes condiciones evaluadas. Las barras en cada una de las columnas representan la desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Cuadro 6.3: Datos descriptivos de los niveles basales del miRNA 199b en cultivo primario de macrófagos humanos en el perfil de infección con DENV-4

Condición	Media	Desviación Estándar	Varianza
No infectado h	21.89	7.98	63.72
Infectado 12 h	21.72	4.43	19.67
Infectado 24 h	24.38	4.05	16.44
Infectado 36 h	25.55	8.76	76.89

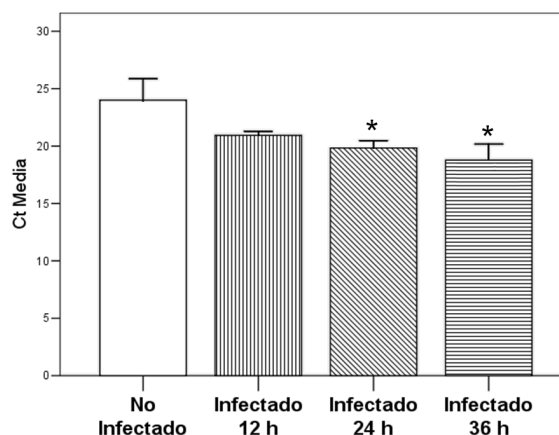


Figura 6.4: **Perfil de expresión del miRNA-199b en células U937 durante una cinética de infección con DENV-4.** El RNA de las células U937 infectadas con DENV-4 a una MOI de 1 por 12, 24, 36 h se utilizó para llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real en la que se amplificó el miRNA-199b. El nivel de expresión del miRNA se normalizó con respecto a la amplificación del 5S rRNA. En el eje Y se muestra el nivel de expresión del miRNA-199b expresado en Ct y en el eje X las diferentes condiciones evaluadas. Las barras en cada una de las columnas representan la desviación estándar de los valores obtenidos de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

En el caso del cultivo de células U937, se encontró que los niveles del miRNA-199b se modificaban con una tendencia a aumentar conforme transcurre el tiempo de infección (Figura 6.4). Al comparar la media de las Cts que se obtuvieron de la RT-PCR en tiempo real con un análisis de ANOVA-Dunnet, se encontró que el incremento en los niveles de expresión del miRNA-199b en cultivos infectados por 24 y 36 h fue significativo ($P < 0.05$) (Cuadro 6.4). Dicho experimento nos sugiere que en las condiciones probadas la infección viral induce un aumento en la expresión del miRNA-199b a las 24 y 36 h posinfección. Debido a que los niveles de expresión fueron muy variables en los cultivos primarios de macrófagos humanos se optó por llevar a cabo los ensayos funcionales sólo con las células U937, ya que en la determinación de

Cuadro 6.4: Análisis estadístico del perfil de expresión del miRNA-199b en células U937 a diferentes cinéticas de infección

Comparación	Diferencia entre medias	q^a	P
No Infectado vs Infectado 12 h	2.835	2.211	ns $p>0.05$
No Infectado vs Infectado 24 h	3.845	2.999	$p<0.05$
No Infectado Vs Infectado 36 h	4.885	3.810	$p<0.05$

^aANOVA. Si el valor de q es mayor a 2.880 entonces el valor de p es significativo.

la expresión del miRNA-199b se obtuvieron resultados más consistentes.

6.4. Efecto de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-199b en la replicación DENV-4

Después de observar un aumento en la expresión del miRNA-199b en las células U937 infectadas, se consideró determinar cual sería su papel en el ciclo replicativo del DENV, para lo cual se recurrió al uso de mimetizadores e inhibidores de su función.

Los mimetizadores del miRNA son moléculas de RNA químicamente modificadas que imitan las funciones del precursor del miRNA, se procesan en la célula huésped para producir un miRNA maduro y producen un efecto similar al que se esperaría cuando se sobreexpresa el miRNA en cuestión. Los inhibidores de los miRNAs son también moléculas de RNA que están químicamente modificadas y que tienen la propiedad de unirse de manera complementaria al miRNA específico y bloquear su función.

La técnica con la que se introdujeron los mimetizadores e inhibidores fue la lipotransfección (ver materiales y métodos). Las condiciones utilizadas para transfectar las células U937 fueron las recomendadas por el fabricante pero también referidas

en otras publicaciones donde el mimetizador y el inhibidor se transfectaron a una concentración final de 50 nM obteniéndose buenos resultados [134, 135, 182, 183].

Las células U937 se transfectaron con el mimetizador o el inhibidor del miRNA-199b a una concentración final de 50 nM de acuerdo con lo señalado en la sección de materiales y métodos. Para estos ensayos se utilizó como control un miRNA que es un precursor de miRNA que no tiene efectos o funciones conocidas en líneas celulares y tejidos humanos.

Posteriormente se obtuvo el RNA y se determinó la eficiencia de infección del virus del dengue mediante RT-PCR en tiempo real. Para detectar el genoma viral se utilizaron iniciadores que amplifican la región carboxilo terminal de la proteína NS5, los cuales fueron reportados previamente y que amplifican un producto de 264 pb [169, 170]. Para normalizar los valores de la amplificación del genoma viral se evaluaron iniciadores para amplificar los genes constitutivos ciclofilina-A (PPI-A), HPRT-1 y 18S rRNA. En el caso de PPI-A los iniciadores empleados fueron los previamente reportados por Islam y Mendenson [173]. Para HPRT1 y RNA ribosomal 18S los iniciadores se diseñaron como se describe en la sección de materiales y métodos.

Para evaluar la utilidad de estos iniciadores se realizó una RT-PCR de punto final y se corroboró la obtención de productos del tamaño molecular esperado (Figura 6.5). Como se puede observar en esta figura, los iniciadores utilizados como control de carga fueron capaces de amplificar los productos esperados dando un producto de aproximadamente 110 pb. En el caso de los genes constitutivos se observa una amplificación en los carriles correspondientes a las condiciones del control negativo de RT; sin embargo, se considera menor y como posible explicación se atribuye a las copias genómicas distribuidas en el DNA humano.

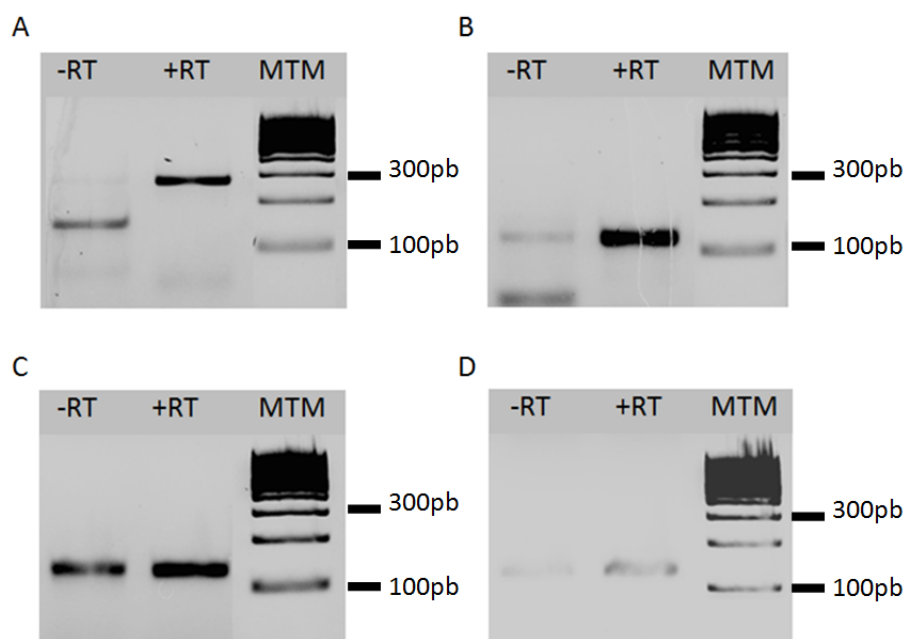


Figura 6.5: **RT-PCR punto final para amplificar DENV-4, HPRT1, PPI-A y 18S rRNA.** 200ng de RNA extraído de células U937 infectadas con DENV-4 se utilizaron para amplificar mediante RT-PCR en punto final el genoma de DENV-4 (A), o los mRNAs de HPRT1 (B), PPI-A (C) y el RNA ribosomal 18S (D). La amplificación se llevó a cabo en presencia o en ausencia de la enzima RT(-RT). Los productos de la amplificación se separaron en geles de agarosa al 2 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en el fotodocumentador Fuji FLA-5100. El marcador de tamaño molecular(MTM) utilizado fue la escalera molecular de 100bp, (Fermentas®).

Aunque en todos los casos se logró obtener una amplificación adecuada se eligió trabajar con los iniciadores para el gen HPRT1 debido que no varía su expresión en las condiciones experimentales de transfección-infección, además de que los niveles de expresión y la pendiente de amplificación de HPRT1 y DENV-4 son muy parecidos. De este modo se decidió normalizar los niveles de expresión de DENV con HPRT1. Por otro lado, la amplificación del genoma del DENV con los iniciadores utilizados en nuestras condiciones de RT-PCR en tiempo real fue exitoso, pudiendo obtener un

amplificado del tamaño esperado (Figuras 6.6 y 6.7).

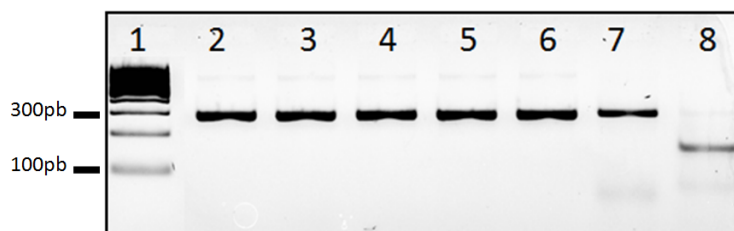


Figura 6.6: Productos de amplificación de la RT-PCR en tiempo real del genoma viral. Las células se U937 se transfectaron en presencia (2) o ausencia (7) del miRNA-control, con 30 nM (3) o 20 nM (4) del mimetizador del miRNA-199b, con 30 nM (5) o 20 nM (6) del inhibidor del miRNA-199b. Después de 24 h de transfección de las células se infectaron con DENV-4 (MOI=1) por 24 h. Los RNAs extraídos de las células tratadas se utilizaron para realizar la RT-PCR en punto final de una secuencia de 264pb correspondientes a una región del extremo carboxilo terminal de NS5. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. El carril (1) corresponde al marcador de peso molecular (100pb) y el carril 8 corresponde a la condición transfectada con el miRNA-control en ausencia de enzima de transcripción reversa.

6.4.1. Determinación del efecto de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-199b en el ciclo de replicación del DENV-4

Para determinar el efecto de los inhibidores y los mimetizadores del miRNA-199b en el ciclo de replicación del DENV-4, se cuantificó el RNA genómico de polaridad positiva del virus mediante RT-PCR en tiempo real, en cultivos que fueron previamente transfectados con estos reactivos e infectados con DENV-4. Para este ensayo se realizó la transfección de 50 nM de los inhibidores y mimetizadores del miRNA-199b en células U937, así como del miRNA control. Después de 24 h de la transfección

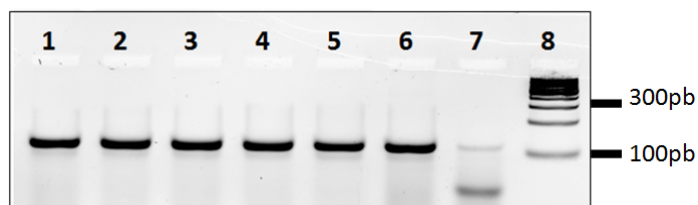


Figura 6.7: **Productos de amplificación de la RT-PCR en tiempo real del gen de expresión constitutiva.** Las células U937 se transfectaron en ausencia (6) o en presencia de 30 nM del miRNA control (1), 20 (4) y 30 nM (5) del inhibidor del miRNA-199b. Después de 24 h de transfección de las células se infectaron con DENV-4 (MOI=1) por 24 h. Los RNAs extraídos de las células tratadas se utilizaron para realizar la RT-PCR en punto final del gen HPRT1. El carril 7 muestra la reacción en ausencia de la enzima de RT. Los productos amplificados se separaron en gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. En el carril 8 se muestran los marcadores de tamaño molecular (escalera de 100pb, Fermentas).

se infectaron las células con DENV-4 a una MOI de 1 y a las 24 h post-infección se determinó la eficiencia de replicación viral mediante la cuantificación del número de copias genoma del virus como se describió anteriormente en la metodología. Como se observa en la figura 6.8, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de genoma viral en las condiciones evaluadas ni con los inhibidores ni con los mimetizadores, con respecto a las tratadas con el miRNA control. Sin embargo al analizar la media del resultado de cada uno de los tres experimentos independientes por triplicado, se puede observar una tendencia en la cual el inhibidor del miRNA-199b favorece la acumulación del RNA viral mientras que el tratamiento con el mimetizador lo disminuye, esto tomando como referencia el número de copias virales en la condición transfectada con el miRNA control. Esto puede ser observado de manera más clara al graficar por separado los resultados de cada una de las series de experimentos realizados (Figura 6.9).

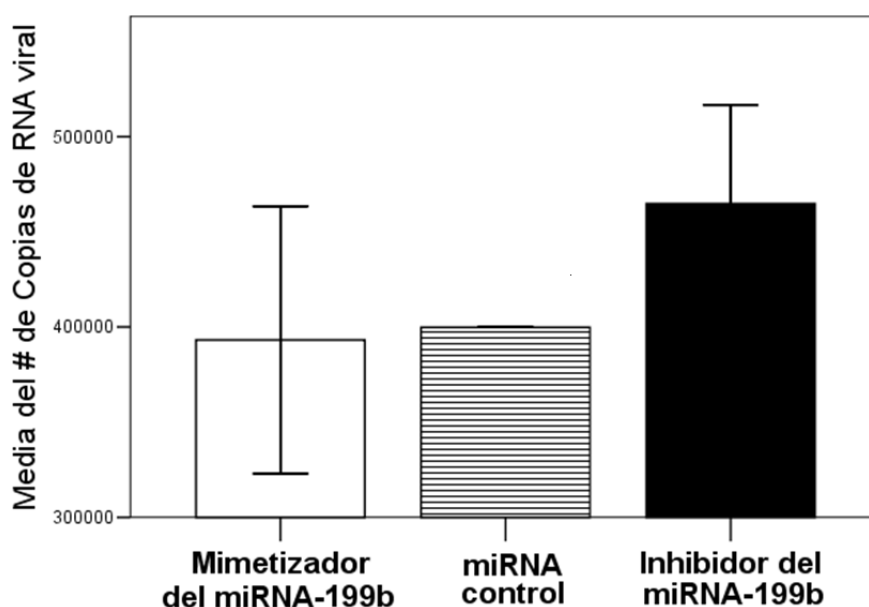


Figura 6.8: **Efecto de los inhibidores y mimetizadores del miRNA-199b en el ciclo replicativo de DENV-4.** Las células U937 se transfectaron con 50 nM del inhibidor o del mimetizador del miRNA-199b o del miRNA control. Después de 24 h de transfección, las células se infectaron con DENV-4 (MOI=1) por 24 h. Los RNAs extraídos de las células tratadas se utilizaron para determinar el número de copias de genoma viral (graficado en el eje Y) normalizado en con respecto al gene de expresión constitutiva. Este gráfico corresponde a tres experimentos realizados de manera independientemente. Las barras de dispersión representan la desviación estándar.

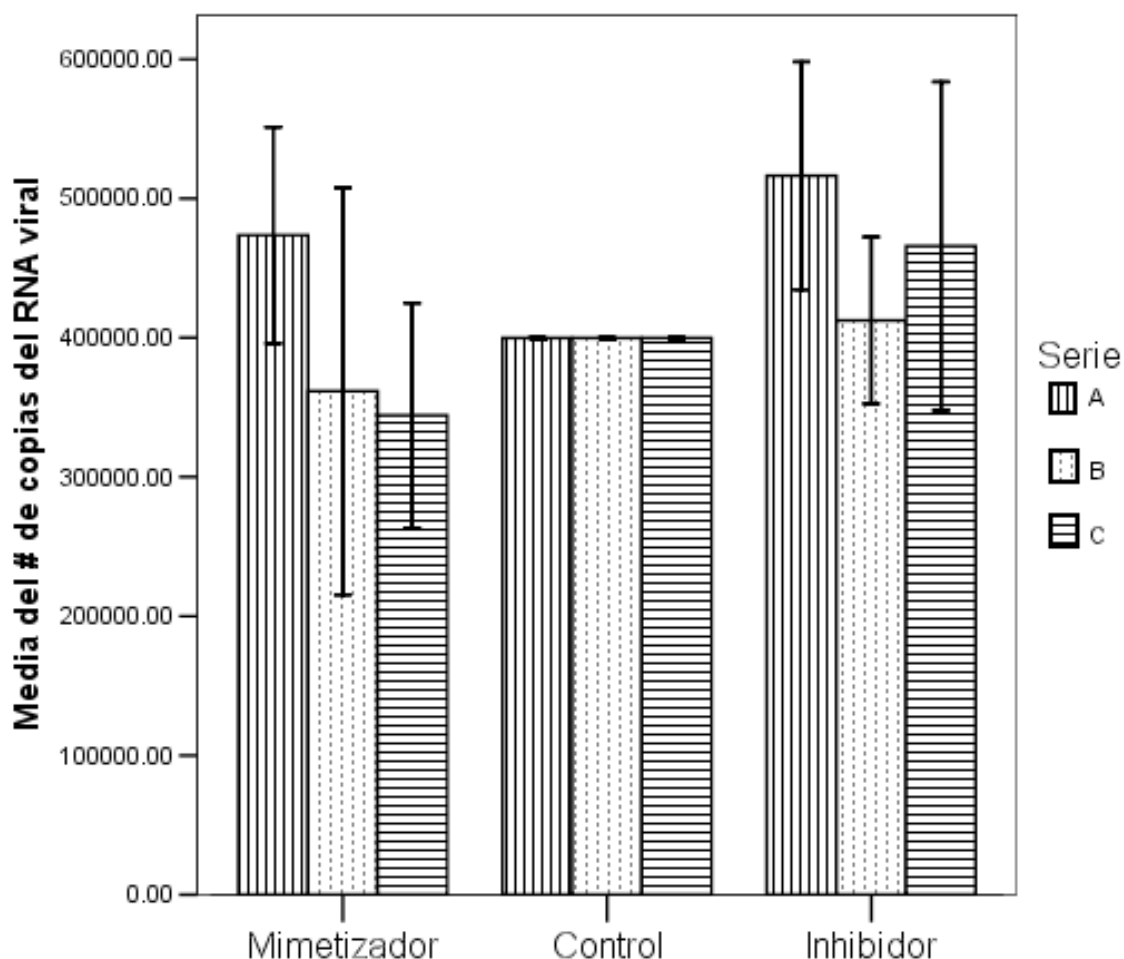


Figura 6.9: **Efecto del miRNA-199b en el ciclo replicativo del DENV-4 en cada serie experimentos.** Las células U937 se transfectaron con 50 nM del inhibidor o del mimetizador del miRNA-199b o del miRNA control. Después de 24 h de transfección, las células se infectaron con DENV-4 (MOI=1) por 24 h. Los RNAs extraídos de las células tratadas se utilizaron para determinar el número de copias de genoma viral (graficado en el eje Y) normalizado en con respecto al gen de expresión constitutiva. Cada serie de experimentos realizados por duplicado se graficó de A-C. Las barras de dispersión representan la desviación estándar.

Capítulo 7

Discusión y análisis de resultados

Distintos grupos de investigación han demostrado que los miRNAs tienen la capacidad de modular de los ciclos replicativos virales, por lo que el interés de este trabajo se centró en investigar las implicaciones que podrían tener los miRNAs que se expresan en una de las principales células blanco de la infección con el DENV como los macrófagos humanos.

Uno de los blancos más importantes de los miRNAs en los mRNAs y en los genomas de RNA virales son las UTRs, por lo que las regiones del genoma que se consideraron en este estudio son las que se encuentran en la 3'UTR. La estrategia para determinar los miRNAs de humano que potencialmente interaccionan con la 3'UTR se basó en el análisis bioinformático de dicha región con el programa ViTA y posteriormente con el programa MirTif. Mediante estos dos programas se determinó que existían diversos miRNAs con interacción potencial en la 3'UTR, de los cuales resultaron especialmente interesantes los que tienen interacción con la 3'CS. Dicha región lleva a cabo funciones de suma importancia en el ciclo replicativo del virus, siendo indispensable para la replicación del genoma viral, además de ser muy conservada.

De entre los miRNAs que interaccionan con la 3'CS se eligió al miRNA-199b, pues su interacción se mantuvo conservada al llevar a cabo el análisis con 10 cepas de DENV-4 y debido a que dicha interacción se predice como real mediante el programa MirTif. Además, este miRNA también reconocía blancos para la 3'CS en diferentes genotipos de DENV-1, DENV-2 y DENV-3 dejando de manifiesto la importancia evolutiva por la conservación no sólo de la región 3'CS sino también de la región de interacción con el miRNA contenida en ella.

Además, diversos estudios con microarreglos de miRNAs han reportado que el miRNA-199b se expresa diferencialmente en los tejidos de mamífero y de modo particular Landgraf y cols. reportaron que la expresión este miRNA en monocitos CD-14⁺ y células dendríticas es mayor que la del miRNA-199a, miRNA-337 y miRNA-338, los cuales se predice tienen la misma MRE en el genoma viral [178].

El miRNA-199b se encuentra codificado en el cromosoma 9 en la región q34.11 dentro de un intrón de la secuencia que codifica para la proteína Dinina (*DYN1_HUMAN*) un transportador de intercambio iónico muy expresado en tejido nervioso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La disminución de la expresión del miRNA-199b ha sido implicada con el desarrollo de metástasis del meduloblastoma, del mismo modo se ha detectado en el desarrollo de tumores pulmonares, cáncer pulmonar y probablemente en el carcinoma hepatocelular [184]. Existen evidencias experimentales que indican que el miRNA-199b modula la expresión de proteínas efectoras de vías proliferativas, de manera particular se ha demostrado experimentalmente un MRE para el miRNA-199b sobre la 3'UTR del mRNA HES1 (principal elemento de respuesta proliferativa Notch) [184]. Además, se ha reportado que el segundo mensajero 4-hidroxinonenal, un antiproliferativo, disminuye la expresión del miRNA-199b en células HL-60 [185].

Debido a que ningún análisis bioinformático puede corroborar funcionalidad biológica como tal sino mas bien una probabilidad de funcionalidad biológica se procedió a evaluar experimentalmente y de modo indirecto el efecto del miRNA-199b en el ciclo de replicación del DENV-4.

En primer lugar, fue necesario determinar el nivel de expresión basal del miRNA-199b en macrófagos humanos tanto de cultivo primario como en la línea celular U937. El resultado obtenido reveló que dicho miRNA se haya expresado de manera basal en ambos tipos celulares, sin embargo su expresión es baja, ya que en el cultivo primario de macrófagos humanos resultó 2^{10} veces menor al compararla con la expresión del gen de expresión constitutiva del 5S rRNA. Es importante recalcar que lo encontrado en nuestros experimentos concuerda con los reportes del nivel de expresión del miRNA-199b, pues se ha reportado una expresión baja de dicho RNA en células del tipo monocito-macrófago [178].

Por otro lado, es preciso mencionar que el nivel de expresión del miRNA-199b en el cultivo primario de macrófagos presentó una gran dispersión, la cual ha sido atribuida a diversos factores dependientes del fondo genético de los donadores, su estado nutricional, compleción física, enfermedades crónicas subdiagnosticadas, etc.

En el caso de lo observado en el cultivo de células U937 con respecto a los niveles basales del miRNA-199b se encontró una relación de 2^{15} al compararlo con los niveles del rRNA 5S, lo cual fue consistente en los experimentos realizados de manera independiente.

Se ha reportado que los miRNAs pueden tener un cambio de expresión sujeto a diversos estímulos y nuestro interés se centró en sus efectos en la infección con el virus del dengue.

Con respecto a los macrófagos de cultivo primario se encontró una tendencia similar a la descrita anteriormente, en la cual los datos exhibieron una gran dispersión en todos los tiempos de la cinética de infección y no se encontraron diferencias significativas en la expresión del miRNA en ninguno de los tiempos postinfección con respecto a las células no infectadas.

Por otro lado, el análisis del perfil de expresión del miRNA-199b en células U937 infectadas a 12, 24 y 36 h postinfección comparado con el de las células no infectadas reveló una inducción sostenida en su expresión, con cambios significativos a las 24 y 36 h. A partir de estos resultados se podría inferir una participación ya sea directa o indirecta de este miRNA en el ciclo replicativo del DENV-4.

Por lo anterior, se optó por lo que se optó por continuar los experimentos de perfil de expresión del miRNA-199b durante una cinética de infección con DENV-4 y de transfección de precursores e inhibidores del miRNA-199b sólo en cultivos con células U937.

Para analizar si la inducción del miRNA-199b podía alterar el ciclo replicativo del DENV-4 se determinó la eficiencia de multiplicación del genoma viral, siendo ésta una de las maneras en la que se podrían observar los efectos positivos o negativos de inhibidores y mimetizadores del miRNA en el ciclo replicativo viral. La cuantificación del RNA genómico de DENV-4 por RT-PCR en tiempo real no mostró diferencias significativas en la cantidad del genoma viral detectado en las células tratadas con los inhibidores y los mimetizadores del miRNA-199b comparada con las células tratadas con el miRNA control. Aunque las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas se puede observar una tendencia al aumento en la detección del genoma viral en las células tratadas con el inhibidor del miRNA-199b y lo contrario cuando se

utilizó el mimetizador, siendo probable que dichas diferencias se acentúen al realizar el ensayo bajo condiciones distintas a las utilizadas en la presente tesis, por ejemplo aumentando el tiempo de infección viral a más de 24 h o el tiempo de transfección de los inhibidores y los mimetizadores de los miRNAs.

Por otro lado, sería importante determinar el nivel de aumento o inhibición del miRNA-199b en las células tratadas con el agonista y el antagonista, asegurando que aunque no existan cambios en la cantidad de RNA viral los niveles del miRNA se están modificando en un nivel adecuado. Existen reportes muy recientes en los que se realizan experimentos similares al que se llevó a cabo en la presente tesis en donde se ha logrado un nivel de aumento o inhibición en la expresión del miRNA diversos miRNAs significativo, el cual ha sido suficiente para describir las funciones de diversos miRNAs [186, 187, 188].

Capítulo 8

Conclusiones

- El miRNA-199b es inducido durante la infección por DENV-4 en células U937.
- El tratamiento con los inhibidores o mimetizadores del miRNA-199b no altera de manera estadísticamente significativa los niveles del genoma viral en células U937 transfectadas por 48 h e infectadas durante 24 h.

Bibliografía

- [1] D. Baltimore, "Expression of animal virus genomes," *Bacteriological Reviews*, vol. 35, pp. 235–41, Sept. 1971. PMID: 4329869.
- [2] I. C. on Taxonomy of Viruses, "Virus taxonomy 2008," 2008. Online accessed 02-Feb-2009; <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2008/>.
- [3] P. K. Russell and A. Nisalak, "Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 99, pp. 291–6, Aug. 1967. PMID: 4961907.
- [4] E. A. Henchal, M. K. Gentry, J. M. McCown, and W. E. Brandt, "Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 31, pp. 830–6, July 1982. PMID: 6285749.
- [5] D. Knipe and P. Howley, *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, 4 ed., 2001.
- [6] W. Reed and J. Carroll, "The etiology of yellow fever: a supplemental note.," *Am Med*, vol. 3, no. 3 Suppl, pp. 301–305, 1902.
- [7] B. L. Casals J, "Hemagglutination with arthropod-borne viruses.," *J Exp Med*, no. 99, pp. 429–449, 1954.
- [8] G. S. y. c. Westaway EG, Brinton MA, "Flaviviridae," *Intervirology*, no. 24, pp. 183–192, 1985.
- [9] W. H. Organization, "Scientific working group, report on dengue," 2006.
- [10] PAHO, "2008: Number of reported cases of dengue dengue hemorrhagic fever, region of the americas by country and subregion," 2008. Online; accessed 02-Feb-2009, Last Update: Epidemiological Week / EW 53, data received 27 January 2009.
- [11] T. Bancroft, "On the aetiology of dengue fever.," *Aust. Med. Gaz.*, no. 25, pp. 17–18, 1906.

- [12] J. S. S. Simmons, J.S. and F. Reynolds, "Experimental studies of dengue.," *Philipp. J. Sci.*, no. 44, pp. 1–247, 1931.
- [13] M. I. Salazar, J. H. Richardson, I. Sánchez-Vargas, K. E. Olson, and B. J. Beaty, "Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected aedes aegypti mosquitoes," *BMC Microbiology*, vol. 7, p. 9, 2007. PMID: 17263893.
- [14] S. S. Whitehead, J. E. Blaney, A. P. Durbin, and B. R. Murphy, "Prospects for a dengue virus vaccine," *Nat Rev Microbiol*, vol. 5, pp. 518–528, Jul 2007.
- [15] W. y. c. Yuwono, J., "Seroepidemiological survey on dengue and japanese encephalitis virus infections in asian monkeys. southeast asian," *J. Trop. Med. Public Health*, no. 15, pp. 194–200, 1984.
- [16] A. Rudnick, "Studies of the ecology of dengue in malaysia," *J. Med. Entomol*, vol. 2, pp. 203–208, 1965.
- [17] P. M. Ashburn and C. Craig, "Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever," *Journal of. Infectious. Disease.*, vol. 4, pp. 440–475, 1907.
- [18] W.H.O., "Dengue/dengue haemorrhagic fever," 2008. Online accessed 03-Feb-2009;<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>.
- [19] P. S, MacPhee. M.
- [20] T. P. Monath, "Dengue: the risk to developed and developing countries," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, pp. 2395–400, Mar. 1994. PMID: 8146129.
- [21] M. Guzman, "Global voices of science. deciphering dengue: the cuban experience," *Science*, vol. 309, pp. 1495–7, 9 2005.
- [22] S. B. Halstead and E. J. O'Rourke, "Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes," *Nature*, vol. 265, pp. 739–41, Feb. 1977. PMID: 404559.
- [23] K. Boonnak, B. M. Slike, T. H. Burgess, R. M. Mason, S. Wu, P. Sun, K. Porter, I. F. Rudiman, D. Yuwono, P. Puthavathana, and M. A. Marovich, "Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection," *Journal of Virology*, vol. 82, pp. 3939–51, Apr. 2008. PMID: 18272578.
- [24] Y. H. Huang, H. Y. Lei, H. S. Liu, Y. S. Lin, C. C. Liu, and T. M. Yeh, "Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 63, no. 1-2, pp. 71–5. PMID: 11357999.
- [25] "Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome," vol. 207, no. 1.

- [26] W. Li, Y. Li, N. Kedersha, P. Anderson, M. Emara, K. M. Swiderek, G. T. Moreno, and M. A. Brinton, "Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the west nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication," *Journal of Virology*, vol. 76, pp. 11989–2000, Dec. 2002. PMID: 12414941.
- [27] P. Y. Shi, W. Li, and M. A. Brinton, "Cell proteins bind specifically to west nile virus minus-strand 3' stem-loop RNA," *Journal of Virology*, vol. 70, pp. 6278–87, Sept. 1996. PMID: 8709255.
- [28] S. J. L. P. Diego E Alvarez, Lodeiro and A. V. Gamarnik, "Long-range rna-rna interactions circularize the dengue virus genome," *Journal of Virology*, vol. 79, pp. 6631–43, June 2005. PMID: 15890901.
- [29] A. A. Khromykh, H. Meka, K. J. Guyatt, and E. G. Westaway, "Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication," *Journal of Virology*, vol. 75, pp. 6719–28, July 2001. PMID: 11413342.
- [30] S. M. Villordo and A. V. Gamarnik, "Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication," *Virus Research*, vol. 139, pp. 230–239, Feb. 2009. PMID: 18703097.
- [31] A. C. Shurtleff, D. W. Beasley, J. J. Chen, H. Ni, M. T. Suderman, H. Wang, R. Xu, E. Wang, S. C. Weaver, D. M. Watts, K. L. Russell, and A. D. Barrett, "Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses," *Virology*, vol. 281, pp. 75–87, Mar. 2001. PMID: 11222098.
- [32] D. E. Alvarez, A. L. D. L. Ezcurra, S. Fucito, and A. V. Gamarnik, "Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication," *Virology*, vol. 339, pp. 200–212, Sept. 2005. PMID: 16002117.
- [33] W. Chiu, R. M. Kinney, and T. W. Dreher, "Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome," *Journal of Virology*, vol. 79, July 2005. PMID: 15956576.
- [34] T. Cui, R. J. Sugrue, Q. Xu, A. K. Lee, Y. C. Chan, and J. Fu, "Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein," *Virology*, vol. 246, pp. 409–17, July 1998. PMID: 9657959.
- [35] C. J. Chen, M. D. Kuo, L. J. Chien, S. L. Hsu, Y. M. Wang, and J. H. Lin, "RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of japanese encephalitis virus genomic RNA," *Journal of Virology*, vol. 71, pp. 3466–73, May 1997. PMID: 9094618.
- [36] L. Zeng, B. Falgout, and L. Markoff, "Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication," *Journal of Virology*, vol. 72, pp. 7510–22, Sept. 1998. PMID: 9696848.

- [37] J. L. Blackwell and M. A. Brinton, "BHK cell proteins that bind to the 3' stem-loop structure of the west nile virus genome RNA," *Journal of Virology*, vol. 69, pp. 5650–8, Sept. 1995. PMID: 7637011.
- [38] J. L. Blackwell and M. A. Brinton, "Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of west nile virus genomic RNA," *Journal of Virology*, vol. 71, pp. 6433–44, Sept. 1997. PMID: 9261361.
- [39] B. Tassaneetrithep, T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich, "DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, pp. 823–9, Apr. 2003. PMID: 12682107.
- [40] E. Navarro-Sanchez, R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and P. Desprès, "Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses," *EMBO Reports*, vol. 4, pp. 723–8, July 2003. PMID: 12783086.
- [41] J. J. H. Chu, P. W. H. Leong, and M. L. Ng, "Characterization of plasma membrane-associated proteins from aedes albopictus mosquito (C6/36) cells that mediate west nile virus binding and infection," *Virology*, vol. 339, pp. 249–60, Sept. 2005. PMID: 15992848.
- [42] J. Ren, T. Ding, W. Zhang, J. Song, and W. Ma, "Does japanese encephalitis virus share the same cellular receptor with other mosquito-borne flaviviruses on the c6/36 mosquito cells?," *Virology Journal*, vol. 4, p. 83, 2007. PMID: 17803826.
- [43] J. L. Miller, B. J. M. deWet, L. Martinez-Pomares, C. M. Radcliffe, R. A. Dwek, P. M. Rudd, and S. Gordon, "The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages," *PLoS Pathogens*, vol. 4, p. e17, Feb. 2008. PMID: 18266465.
- [44] H. Liu, S. Chiou, and W. Chen, "Differential binding efficiency between the envelope protein of japanese encephalitis virus variants and heparan sulfate on the cell surface," *Journal of Medical Virology*, vol. 72, pp. 618–24, Apr. 2004. PMID: 14981764.
- [45] S. Jindadamrongwech, C. Thepparit, and D. R. Smith, "Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2," *Archives of Virology*, vol. 149, pp. 915–27, May 2004. PMID: 15098107.
- [46] M. N. Krishnan, B. Sukumaran, U. Pal, H. Agaisse, J. L. Murray, T. W. Hodge, and E. Fikrig, "Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and west nile viruses," *Journal of Virology*, vol. 81, pp. 4881–5, May 2007. PMID: 17301152.
- [47] K. Stiasny, C. Kössl, J. Lepault, F. A. Rey, and F. X. Heinz, "Characterization of a structural intermediate of flavivirus membrane fusion," *PLoS Pathogens*, vol. 3, p. e20, Feb. 2007. PMID: 17305426.

- [48] F. A. Rey, F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison, "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution," *Nature*, vol. 375, pp. 291–8, May 1995. PMID: 7753193.
- [49] L. Markoff, B. Falgout, and A. Chang, "A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein," *Virology*, vol. 233, pp. 105–17, June 1997. PMID: 9201220.
- [50] E. Konishi and P. W. Mason, "Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein," *Journal of Virology*, vol. 67, pp. 1672–5, Mar. 1993. PMID: 8437237.
- [51] B. D. Lindenbach and C. M. Rice, "trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication," *Journal of Virology*, vol. 71, pp. 9608–17, Dec. 1997. PMID: 9371625.
- [52] B. D. Lindenbach and C. M. Rice, "Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function," *Journal of Virology*, vol. 73, pp. 4611–21, June 1999. PMID: 10233920.
- [53] J. E. Ludert, C. Mosso, I. Ceballos-Olvera, and R. M. del Angel, "Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells," *Virology Journal*, vol. 5, p. 51, 2008. PMID: 18439289.
- [54] P. R. Young, P. A. Hilditch, C. Bletchly, and W. Halloran, "An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, pp. 1053–7, Mar. 2000. PMID: 10698995.
- [55] P. W. Chu and E. G. Westaway, "Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA," *Archives of Virology*, vol. 125, no. 1-4, pp. 177–91, 1992. PMID: 1322651.
- [56] H. M. Murthy, S. Chum, and R. Padmanabhan, "Dengue virus NS3 serine protease crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, pp. 5573–80, Feb. 1999. PMID: 10026173.
- [57] M. Kapoor, L. Zhang, M. Ramachandra, J. Kusukawa, K. E. Ebner, and R. Padmanabhan, "Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, pp. 19100–6, Aug. 1995. PMID: 7642575.
- [58] S. Miller, S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Bühler, and R. Bartenschlager, "The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 8873–82, Mar. 2007. PMID: 17276984.

- [59] S. Miller, S. Sparacio, and R. Bartenschlager, "Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, pp. 8854–63, Mar. 2006. PMID: 16436383.
- [60] J. L. Muñoz-Jordan, G. G. Sánchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, and A. García-Sastre, "Inhibition of interferon signaling by dengue virus," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, pp. 14333–8, Nov. 2003. PMID: 14612562.
- [61] M. Jones, A. Davidson, L. Hibbert, P. Gruenwald, J. Schlaak, S. Ball, G. R. Foster, and M. Jacobs, "Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression," *Journal of Virology*, vol. 79, pp. 5414–20, May 2005. PMID: 15827155.
- [62] K. Werme, M. Wigerius, and M. Johansson, "Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling," *Cellular Microbiology*, vol. 10, pp. 696–712, Mar. 2008. PMID: 18042258.
- [63] R. Lin, B. Chang, H. Yu, C. Liao, and Y. Lin, "Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism," *Journal of Virology*, vol. 80, pp. 5908–5918, June 2006. PMID: 16731929.
- [64] G. S. Park, K. L. Morris, R. G. Hallett, M. E. Bloom, and S. M. Best, "Identification of residues critical for the interferon antagonist function of langat virus NS5 reveals a role for the RNA-dependent RNA polymerase domain," *Journal of Virology*, vol. 81, pp. 6936–46, July 2007. PMID: 17459929.
- [65] I. Umareddy, A. Chao, A. Sampath, F. Gu, and S. G. Vasudevan, "Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA," *The Journal of General Virology*, vol. 87, pp. 2605–2614, Sept. 2006. PMID: 16894199.
- [66] C. Welsch, M. Albrecht, J. Maydt, E. Herrmann, M. W. Welker, C. Sarrazin, A. Scheidig, T. Lengauer, and S. Zeuzem, "Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae," *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, vol. 26, pp. 546–57, Sept. 2007. PMID: 17507273.
- [67] R. Perera and R. J. Kuhn, "Structural proteomics of dengue virus," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 11, pp. 369–77, Aug. 2008. PMID: 18644250.
- [68] M. J. Pryor, S. M. Rawlinson, R. E. Butcher, C. L. Barton, T. A. Waterhouse, S. G. Vasudevan, P. G. Bardin, P. J. Wright, D. A. Jans, and A. D. Davidson, "Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 8, pp. 795–807, July 2007. PMID: 17537211.
- [69] E. V. Koonin, "Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus," *The*

- Journal of General Virology*, vol. 74 (Pt 4), pp. 733–40, Apr. 1993. PMID: 8385698.
- [70] L. L. Conte, B. Ailey, T. J. P. Hubbard, S. E. Brenner, A. G. Murzin, and C. Chothia, “SCOP: a structural classification of proteins database,” *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 1, p. 257–259, 2000. PMC102479.
 - [71] Y. Zhou, D. Ray, Y. Zhao, H. Dong, S. Ren, Z. Li, Y. Guo, K. A. Bernard, P. Shi, and H. Li, “Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase,” *Journal of Virology*, vol. 81, pp. 3891–903, Apr. 2007. PMID: 17267492.
 - [72] H. Malet, M. Egloff, B. Selisko, R. E. Butcher, P. J. Wright, M. Roberts, A. Gruez, G. Sulzenbacher, C. Vornrhein, G. Bricogne, J. M. Mackenzie, A. A. Khromykh, A. D. Davidson, and B. Canard, “Crystal structure of the RNA polymerase domain of the west nile virus non-structural protein 5,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 10678–89, Apr. 2007. PMID: 17287213.
 - [73] B. Selisko, H. Dutartre, J. Guillemot, C. Debarnot, D. Benarroch, A. Khromykh, P. Desprès, M. Egloff, and B. Canard, “Comparative mechanistic studies of de novo RNA synthesis by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases,” *Virology*, vol. 351, pp. 145–58, July 2006. PMID: 16631221.
 - [74] H. Malet, N. Massé, B. Selisko, J. Romette, K. Alvarez, J. C. Guillemot, H. Toulou, T. L. Yap, S. Vasudevan, J. Lescar, and B. Canard, “The flavivirus polymerase as a target for drug discovery,” *Antiviral Research*, vol. 80, pp. 23–35, Oct. 2008. PMID: 18611413.
 - [75] S. M. Best, K. L. Morris, J. G. Shannon, S. J. Robertson, D. N. Mitzel, G. S. Park, E. Boer, J. B. Wolfenbarger, and M. E. Bloom, “Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist,” *Journal of Virology*, vol. 79, pp. 12828–39, Oct. 2005. PMID: 16188985.
 - [76] J. Xiang, C. Martinez-Smith, M. Gale, Q. Chang, D. R. Labrecque, W. N. Schmidt, and J. T. Stapleton, “GB virus type c NS5A sequence polymorphisms: association with interferon susceptibility and inhibition of PKR-mediated eIF2alpha phosphorylation,” *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, vol. 25, pp. 261–270, May 2005. PMID: 15871663.
 - [77] S. J. Wu, G. Grouard-Vogel, W. Sun, J. R. Mascola, E. Brachtel, R. Putvatana, M. K. Louder, L. Filgueira, M. A. Marovich, H. K. Wong, A. Blauvelt, G. S. Murphy, M. L. Robb, B. L. Innes, D. L. Birx, C. G. Hayes, and S. S. Frankel, “Human skin langerhans cells are targets of dengue virus infection,” *Nature Medicine*, vol. 6, pp. 816–20, July 2000. PMID: 10888933.
 - [78] C. Mosso, I. J. Galván-Mendoza, J. E. Ludert, and R. M. del Angel, “Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line c6/36 HT,” *Virology*, vol. 378, pp. 193–9, Aug. 2008. PMID: 18571214.

- [79] V. Cao-Lormeau, “Dengue viruses binding proteins from *aedes aegypti* and *aedes polynesiensis* salivary glands,” *Virology Journal*, vol. 6, p. 35, 2009. PMID: 19320997.
- [80] Z. Kou, M. Quinn, H. Chen, W. W. S. I. Rodrigo, R. C. Rose, J. J. Schlesinger, and X. Jin, “Monocytes, but not t or b cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells,” *Journal of Medical Virology*, vol. 80, no. 1, pp. 134–46, 2008. PMID: 18041019.
- [81] S. Blackley, Z. Kou, H. Chen, M. Quinn, R. C. Rose, J. J. Schlesinger, M. Coppage, and X. Jin, “Primary human splenic macrophages, but not t or b cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro,” *Journal of Virology*, vol. 81, pp. 13325–34, Dec. 2007. PMID: 17928355.
- [82] P. Chingsuwanrote, L. Suksanpaisan, and D. R. Smith, “Adaptation of the plaque assay methodology for dengue virus infected HepG2 cells,” *Journal of Virological Methods*, vol. 116, pp. 119–121, Mar. 2004. PMID: 14738977.
- [83] V. Ambros and H. R. Horvitz, “Heterochronic mutants of the nematode *caenorhabditis elegans*,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 226, pp. 409–16, Oct. 1984. PMID: 6494891.
- [84] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, “The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, vol. 75, pp. 843–54, Dec. 1993. PMID: 8252621.
- [85] B. Wightman, I. Ha, and G. Ruvkun, “Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *c. elegans*,” *Cell*, vol. 75, pp. 855–62, Dec. 1993. PMID: 8252622.
- [86] B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, and G. Ruvkun, “The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *caenorhabditis elegans*,” *Nature*, vol. 403, pp. 901–6, Feb. 2000. PMID: 10706289.
- [87] E. G. Moss, R. C. Lee, and V. Ambros, “The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *c. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA,” *Cell*, vol. 88, pp. 637–46, Mar. 1997. PMID: 9054503.
- [88] V. Ambros, “microRNAs: tiny regulators with great potential,” *Cell*, vol. 107, pp. 823–6, Dec. 2001. PMID: 11779458.
- [89] R. C. Lee and V. Ambros, “An extensive class of small RNAs in *caenorhabditis elegans*,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, pp. 862–4, Oct. 2001. PMID: 11679672.
- [90] H. Cao, C. shun Yang, and T. M. Rana, “Evolutionary emergence of microRNAs in human embryonic stem cells,” *PLoS ONE*, vol. 3, no. 7, p. e2820, 2008. PMID: 18665260.

- [91] M. Frasch, "A matter of timing: microRNA-controlled temporal identities in worms and flies," *Genes & Development*, vol. 22, pp. 1572–6, June 2008. PMID: 18559473.
- [92] J. Krützfeldt and M. Stoffel, "MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism," *Cell Metabolism*, vol. 4, pp. 9–12, July 2006. PMID: 16814728.
- [93] R. R. Chivukula and J. T. Mendell, "Circular reasoning: microRNAs and cell-cycle control," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 33, pp. 474–81, Oct. 2008. PMID: 18774719.
- [94] V. N. Kim, "Cell cycle micromanagement in embryonic stem cells," *Nature Genetics*, vol. 40, pp. 1391–2, Dec. 2008. PMID: 19029973.
- [95] A. Ventura and T. Jacks, "MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way," *Cell*, vol. 136, pp. 586–91, Feb. 2009. PMID: 19239879.
- [96] R. Garzon, S. Liu, M. Fabbri, Z. Liu, C. E. A. Heaphy, E. Callegari, S. Schwind, J. Pang, J. Yu, N. Muthusamy, V. Havelange, S. Volinia, W. Blum, L. J. Rush, D. Perrotti, M. Andreeff, C. D. Bloomfield, J. C. Byrd, K. Chan, L. Wu, C. M. Croce, and G. Marcucci, "MicroRNA -29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene re-expression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1," *Blood*, Feb. 2009. PMID: 19211935.
- [97] C. Lecellier, P. Dunoyer, K. Arar, J. Lehmann-Che, S. Eyquem, C. Himber, A. Saïb, and O. Voinnet, "A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 308, pp. 557–60, Apr. 2005. PMID: 15845854.
- [98] C. J. T. T. S. K. P. S. L. M. L. P. K. S. L. B. C. M. W. D. R. J. J. J. B. M. S. R. S. C. Z. M. T. T. R. C. Randall G, Panis M, "Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 31, pp. 12884–9.
- [99] C. S. Sullivan, A. T. Grundhoff, S. Tevethia, J. M. Pipas, and D. Ganem, "SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic t cells," *Nature*, vol. 435, pp. 682–6, June 2005. PMID: 15931223.
- [100] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim, "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II," *The EMBO Journal*, vol. 23, pp. 4051–60, Oct. 2004. PMID: 15372072.
- [101] G. M. Borchert, W. Lanier, and B. L. Davidson, "RNA polymerase III transcribes human microRNAs," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 13, pp. 1097–101, Dec. 2006. PMID: 17099701.
- [102] V. N. Kim, J. Han, and M. C. Siomi, "Biogenesis of small RNAs in animals," *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 10, pp. 126–39, Feb. 2009. PMID: 19165215.

- [103] R. I. Gregory, T. P. Chendrimada, and R. Shiekhattar, "MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex," *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 342, pp. 33–47, 2006. PMID: 16957365.
- [104] H. Seitz and P. D. Zamore, "Rethinking the microprocessor," *Cell*, vol. 125, pp. 827–9, June 2006. PMID: 16751089.
- [105] B. R. Cullen, "Transcription and processing of human microRNA precursors," *Molecular Cell*, vol. 16, pp. 861–5, Dec. 2004. PMID: 15610730.
- [106] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen, "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs," *Genes & Development*, vol. 17, pp. 3011–6, Dec. 2003. PMID: 14681208.
- [107] E. Lund, S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, and U. Kutay, "Nuclear export of microRNA precursors," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5654, pp. 95–8, 2004. PMID: 14631048.
- [108] J. G. Ruby, C. H. Jan, and D. P. Bartel, "Intronic microRNA precursors that bypass droscha processing," *Nature*, vol. 448, pp. 83–6, July 2007. PMID: 17589500.
- [109] K. Okamura, J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler, and E. C. Lai, "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in drosophila," *Cell*, vol. 130, pp. 89–100, July 2007. PMID: 17599402.
- [110] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon, "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in drosophila cells," *Nature*, vol. 404, pp. 293–6, Mar. 2000. PMID: 10749213.
- [111] D. Murphy, B. Dancis, and J. R. Brown, "The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 8, p. 92, 2008. PMID: 18366743.
- [112] E. J. Sontheimer, "Assembly and function of RNA silencing complexes," *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 6, pp. 127–38, Feb. 2005. PMID: 15654322.
- [113] Y. Wang, S. Juranek, H. Li, G. Sheng, T. Tuschl, and D. J. Patel, "Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex," *Nature*, vol. 456, pp. 921–6, Dec. 2008. PMID: 19092929.
- [114] J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, and G. J. Hannon, "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 305, pp. 1437–41, Sept. 2004. PMID: 15284456.
- [115] M. Kiriakidou, G. S. Tan, S. Lamprinaki, M. D. Planell-Saguer, P. T. Nelson, and Z. Mourelatos, "An mRNA m7G cap binding-like motif within human ago2 represses translation," *Cell*, vol. 129, pp. 1141–1151, June 2007. PMID: 17524464.

- [116] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore, "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex," *Cell*, vol. 115, pp. 199–208, Oct. 2003. PMID: 14567917.
- [117] B. P. Lewis, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets," *Cell*, vol. 120, no. 1, pp. 15–20, 2005. PMID: 15652477.
- [118] K. C. Miranda, T. Huynh, Y. Tay, Y. Ang, W. Tam, A. M. Thomson, B. Lim, and I. Rigoutsos, "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes," *Cell*, vol. 126, pp. 1203–1217, Sept. 2006. PMID: 16990141.
- [119] M. Kiriakidou, P. T. Nelson, A. Kouranov, P. Fitziev, C. Bouyioukos, Z. Mourelatos, and A. Hatzigeorgiou, "A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets," *Genes & Development*, vol. 18, pp. 1165–1178, May 2004. PMID: 15131085.
- [120] A. J. Giraldez, Y. Mishima, J. Rihel, R. J. Grocock, S. V. Dongen, K. Inoue, A. J. Enright, and A. F. Schier, "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 312, pp. 75–79, Apr. 2006. PMID: 16484454.
- [121] M. Wakiyama, K. Takimoto, O. Ohara, and S. Yokoyama, "Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system," *Genes & Development*, vol. 21, pp. 1857–1862, Aug. 2007. PMID: 17671087.
- [122] S. Iwasaki, T. Kawamata, and Y. Tomari, "Drosophila argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression," *Molecular Cell*, vol. 34, pp. 58–67, Apr. 2009. PMID: 19268617.
- [123] L. Wu, J. Fan, and J. G. Belasco, "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, pp. 4034–4039, Mar. 2006. PMID: 16495412.
- [124] W. C. Merrick, "Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems," *Gene*, vol. 332, pp. 1–11, May 2004. PMID: 15145049.
- [125] R. Thermann and M. W. Hentze, "Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation," *Nature*, vol. 447, pp. 875–878, June 2007. PMID: 17507927.
- [126] T. P. Chendrimada, K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli, and R. Shiekhattar, "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6," *Nature*, vol. 447, pp. 823–828, June 2007. PMID: 17507929.
- [127] S. Nottrott, M. J. Simard, and J. D. Richter, "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 13, pp. 1108–1114, Dec. 2006. PMID: 17128272.

- [128] U. Sheth and R. Parker, “Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, pp. 805–808, May 2003. PMID: 12730603.
- [129] R. S. Pillai, S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz, “Inhibition of translational initiation by let-7 MicroRNA in human cells,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 309, pp. 1573–1576, Sept. 2005. PMID: 16081698.
- [130] S. N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs, and W. Filipowicz, “Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA p-body localization in human cells,” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 71, pp. 513–521, 2006. PMID: 17381334.
- [131] J. I. Henke, D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schüttler, C. Fehr, C. Jünnemann, and M. Niepmann, “microRNA-122 stimulates translation of hepatitis c virus RNA,” *The EMBO Journal*, vol. 27, pp. 3300–3310, Dec. 2008. PMID: 19020517.
- [132] S. P. Jopling CL, Norman KL, “Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122,” *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, pp. 369–76, 2006.
- [133] S. Vasudevan and J. A. Steitz, “AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and argonaute 2,” *Cell*, vol. 128, pp. 1105–1118, Mar. 2007. PMID: 17382880.
- [134] S. Vasudevan, Y. Tong, and J. A. Steitz, “Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 318, pp. 1931–1934, Dec. 2007. PMID: 18048652.
- [135] R. F. Place, L. Li, D. Pookot, E. J. Noonan, and R. Dahiya, “MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, pp. 1608–1613, Feb. 2008. PMID: 18227514.
- [136] D. H. Kim, P. Saetrom, O. Snøve, and J. J. Rossi, “MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, pp. 16230–16235, Oct. 2008. PMID: 18852463.
- [137] M. S. Weinberg, L. M. Villeneuve, A. Ehsani, M. Amarzguioui, L. Aagaard, Z. Chen, A. D. Riggs, J. J. Rossi, and K. V. Morris, “The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells,” *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 12, pp. 256–262, Feb. 2006. PMID: 16373483.
- [138] J. Han, D. Kim, and K. V. Morris, “Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, pp. 12422–12427, July 2007. PMID: 17640892.

- [139] K. V. Morris, "RNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 320, pp. 211–224, 2008. PMID: 18268846.
- [140] S. Griffiths-Jones, H. K. Saini, S. van Dongen, and A. J. Enright, "miRBase: tools for microRNA genomics," *Nucleic Acids Research*, vol. 36, no. Database issue, pp. D154–158, 2008. PMID: 17991681.
- [141] T. Huang, B. Fan, M. F. Rothschild, Z. Hu, K. Li, and S. Zhao, "MiRFinder: an improved approach and software implementation for genome-wide fast microRNA precursor scans," *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 341, 2007. PMID: 17868480.
- [142] D. Gaidatzis, E. van Nimwegen, J. Hausser, and M. Zavolan, "Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis," *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 69, 2007. PMID: 17331257.
- [143] R. C. Friedman, K. K. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs," *Genome Research*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, 2009. PMID: 18955434.
- [144] A. Grimson, K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, and D. P. Bartel, "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing," *Molecular Cell*, vol. 27, pp. 91–105, July 2007. PMID: 17612493.
- [145] B. John, A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks, "Human MicroRNA targets," *PLoS Biology*, vol. 2, p. e363, Nov. 2004. PMID: 15502875.
- [146] A. Krek, D. Grün, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky, "Combinatorial microRNA target predictions," *Nature Genetics*, vol. 37, pp. 495–500, May 2005. PMID: 15806104.
- [147] J. Ruan, H. Chen, L. Kurgan, K. Chen, C. Kang, and P. Pu, "HuMiTar: a sequence-based method for prediction of human microRNA targets," *Algorithms for Molecular Biology: AMB*, vol. 3, p. 16, 2008. PMID: 19102780.
- [148] Y. Yang, Y. Wang, and K. Li, "MiRTif: a support vector machine-based microRNA target interaction filter," *BMC Bioinformatics*, vol. 9 Suppl 12, p. S4, 2008. PMID: 19091027.
- [149] Y. K. Kim, S. H. Lee, C. S. Kim, S. K. Seol, and S. K. Jang, "Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis c virus modulates the IRES-dependent translation," *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 9, pp. 599–606, May 2003. PMID: 12702818.
- [150] W. S. V. S. C. C. F. D. M. Pedersen IM, Cheng G, "Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism,"

- [151] L. R. B. H. Shan Y, Zheng J, “Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes,” *Gastroenterology*, vol. 133, pp. 1166–74, Oct 2007.
- [152] J. D. G. H. T. J. B. T. Chang J, Guo JT, “Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells,” *J Virol*, vol. 82, pp. 8215–23, Aug 2008.
- [153] R. Triboulet, B. Mari, Y. Lin, C. Chable-Bessia, Y. Bennasser, K. Lebrigand, B. Cardinaud, T. Maurin, P. Barbry, V. Baillat, J. Reynes, P. Corbeau, K. Jeang, and M. Benkirane, “Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 315, pp. 1579–1582, Mar. 2007. PMID: 17322031.
- [154] Y. Bennasser, M. L. Yeung, and K. Jeang, “HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, pp. 27674–8, Sept. 2006. PMID: 16887810.
- [155] Z. Klase, P. Kale, R. Winograd, M. V. Gupta, M. Heydarian, R. Berro, T. McCaffrey, and F. Kashanchi, “HIV-1 TAR element is processed by dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR,” *BMC Molecular Biology*, vol. 8, p. 63, 2007. PMID: 17663774.
- [156] G. J. Seo, L. H. L. Fink, B. O’Hara, W. J. Atwood, and C. S. Sullivan, “Evolutionarily conserved function of a viral microRNA,” *Journal of Virology*, vol. 82, pp. 9823–8, Oct. 2008. PMID: 18684810.
- [157] C. Cui, A. Griffiths, G. Li, L. M. Silva, M. F. Kramer, T. Gaasterland, X. Wang, and D. M. Coen, “Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs,” *Journal of Virology*, vol. 80, pp. 5499–508, June 2006. PMID: 16699030.
- [158] J. L. Umbach, M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski, D. M. Coen, and B. R. Cullen, “MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs,” *Nature*, vol. 454, pp. 780–3, Aug. 2008. PMID: 18596690.
- [159] A. A. Matskevich and K. Moelling, “Dicer is involved in protection against influenza a virus infection,” *The Journal of General Virology*, vol. 88, pp. 2627–35, Oct. 2007. PMID: 17872512.
- [160] P. W. Hsu, L. Lin, S. Hsu, J. B. Hsu, and H. Huang, “ViTa: prediction of host microRNAs targets on viruses,” *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. Database issue, pp. D381–5, 2007. PMID: 17148483.
- [161] T. Matsunaga, M. Takahashi, T. Yoshino, M. Kuhara, and H. Takeyama, “Magnetic separation of CD14+ cells using antibody binding with protein a expressed on bacterial magnetic particles for generating dendritic cells,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 350, pp. 1019–1025, Dec. 2006. PMID: 17045961.

- [162] U. Repnik, M. Knezevic, and M. Jeras, "Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats," *Journal of Immunological Methods*, vol. 278, pp. 283–292, July 2003. PMID: 12957415.
- [163] C. Sundström and K. Nilsson, "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)," *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 17, pp. 565–577, May 1976. PMID: 178611.
- [164] B. Malewicz and H. M. Jenkin, "Development of dengue virus plaques under serum-free overlay medium," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 9, pp. 609–614, May 1979. PMID: 39085.
- [165] A. Biosystems, "Página de inicio de ambion, catálogo y soporte técnico." Website, 07 2009. <http://www.ambion.com> accesado 16 de julio de 2009.
- [166] P. Chomczynski and N. Sacchi, "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 2, pp. 581–585, 2006. PMID: 17406285.
- [167] Invitrogen, "Página de inicio de invitrogen, catálogo y soporte técnico." Website, 07 2009. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html> accesado 16 de julio de 2009.
- [168] R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith, "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences," *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, vol. 10, pp. 413–417, Apr. 1992. PMID: 1368485.
- [169] L. Chien, T. Liao, P. Shu, J. Huang, D. J. Gubler, and G. J. Chang, "Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, pp. 1295–1304, Apr. 2006. PMID: 16597854.
- [170] G. Kuno, G. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos, and C. B. Cropp, "Phylogeny of the genus flavivirus," *Journal of Virology*, vol. 72, no. 1, pp. 73–83, 1998. PMID: 9420202.
- [171] G. yu Li, B. Fan, Y. zhen Wu, X. rui Wang, Y. hui Wang, and J. xiang Wu, "Inhibition of vascular endothelial growth factor gene expression by T7-siRNAs in cultured human retinal pigment epithelial cells," *Chinese Medical Journal*, vol. 118, pp. 567–573, Apr. 2005. PMID: 15820087.
- [172] M. A. Marko, R. Chipperfield, and H. C. Birnboim, "A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder," *Analytical Biochemistry*, vol. 121, pp. 382–387, Apr. 1982. PMID: 6179438.
- [173] K. N. Islam and C. R. Mendelson, "Permissive effects of oxygen on cyclic AMP and interleukin-1 stimulation of surfactant protein a gene expression are mediated by epigenetic mechanisms," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, pp. 2901–2912, Apr. 2006. PMID: 16581766.

- [174] promega, “Página de inicio de promega, catálogo y soporte técnico.” Website, 07 2009. <http://www.promega.com/Default.aspx>accesado 16 de julio de 2009.
- [175] F. D’Herelle, “On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by mr. f. D’Herelle, presented by mr. roux. 1917,” *Research in Microbiology*, vol. 158, pp. 553–554, Sept. 2007. PMID: 17855060.
- [176] R. DULBECCO and M. VOGT, “Biological properties of poliomyelitis viruses as studied by the plaque technique,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 61, pp. 790–800, Sept. 1955. PMID: 13340585.
- [177] B. P. Lewis, I. hung Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge, “Prediction of mammalian microRNA targets,” *Cell*, vol. 115, pp. 787–98, Dec. 2003. PMID: 14697198.
- [178] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. D. Vita, D. Frezzetti, H. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. D. Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, and T. Tuschl, “A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing,” *Cell*, vol. 129, pp. 1401–1414, June 2007. PMID: 17604727.
- [179] J. Takamizawa, H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, and T. Takahashi, “Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival,” *Cancer Research*, vol. 64, pp. 3753–6, June 2004. PMID: 15172979.
- [180] B. L. Pineles, R. Romero, D. Montenegro, A. L. Tarca, Y. M. Han, Y. M. Kim, S. Draghici, J. Espinoza, J. P. Kusanovic, P. Mittal, S. S. Hassan, and C. J. Kim, “Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 196, pp. 261.e1–6, Mar. 2007. PMID: 17346547.
- [181] H. J. Peltier and G. J. Latham, “Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues,” *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 14, pp. 844–52, May 2008. PMID: 18375788.
- [182] D. E. Kuhn, M. M. Martin, D. S. Feldman, A. V. Terry, G. J. Nuovo, and T. S. Elton, “Experimental validation of miRNA targets,” *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 44, no. 1, pp. 47–54, 2008. PMID: 18158132.
- [183] A. Biosystems, “Página de inicio de ambion, catálogo y soporte técnico.” Website, 07 2009. <http://ambion.com/techlib/spec/sp4392431.pdf>.

- [184] L. Garzia, I. Andolfo, E. Cusanelli, N. Marino, G. Petrosino, D. D. Martino, V. Esposito, A. Galeone, L. Navas, S. Esposito, S. Gargiulo, S. Fattet, V. Donofrio, G. Cinalli, A. Brunetti, L. D. Vecchio, P. A. Northcott, O. Delattre, M. D. Taylor, A. Iolascon, and M. Zollo, "MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma," *PloS One*, vol. 4, no. 3, p. e4998, 2009. PMID: 19308264.
- [185] S. Pizzimenti, M. Ferracin, S. Sabbioni, C. Toaldo, P. Pettazzoni, M. U. Dianzani, M. Negrini, and G. Barrera, "MicroRNA expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 46, no. 2, pp. 282–288, 2009. PMID: 19022373.
- [186] Y.-F. Gao, L. Yu, W. Wei, J.-B. Li, Q.-L. Luo, and J.-L. Shen, "Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA.," *World journal of gastroenterology*, vol. 139, pp. 4684–9, Aug. 2008. PMID: 18698684.
- [187] C.-y. Chu and T. M. Rana, "Translation repression in human cells by microrna-induced gene silencing requires rck/p54," *PLoS Biol*, vol. 4, p. e210, 06 2006.
- [188] S. Roy, S. Khanna, S. A. Hussain, S. Biswas, A. Azad, C. Rink, S. Gnyawali, S. Shilo, G. J. Nuovo, and C. K. Sen, "MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue," *Cardiovascular Research*, vol. 82, pp. 21–29, Apr. 2009. PMID: 19147652.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE
MÉXICO

Fecha: **Septiembre 2009**

Autor: **Horacio Emmanuel Fonseca Sánchez**

Título: **Efecto del miRNA-199b en el ciclo replicativo del
virus del dengue**

Colegio: **Posgrado en Ciencias Genómicas**

Grado: **M.C.G.** Fecha de candidatura: **Septiembre 25** Año: **2009**

Firma del autor

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 25 de septiembre de 2009, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Médico Cirujano Horacio Emmanuel Fonseca Sánchez

Dra. Martha Yocupicio Monroy

Dra. Selene Zárate Guerra

Dra. Rosa María del Ángel Núñez

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dr. Juan Ludert León
