

UACM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
NADA HUMANO ME ES AJENO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**‘Efecto del hsa-miR-149* de humanos en la vía de TGF- β
en respuesta a la infección por Dengue’**

T E S I S

Que para obtener el título de

Maestro en Ciencias Genómicas

Presenta

Biol. Exp. Berenice Eugenia Gil Rodríguez

Directora de tesis

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

MÉXICO, D.F. ENERO 2012

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

ASESORES

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

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

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 de virología 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 María del Ángel del Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

Esta tesis se llevo a cabo gracias al financiamiento por parte de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, el Instituto de Ciencia y Tecnología del DF (Convenio UACM-CSE-ICyTDF/88/2011) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto SEP-CONACyT 60282).

.

At mis hijos:
Rodrigo Manzo e Ian Luca Maraschini

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la enseñanza académica y de vida recibida en este periodo de tiempo.

Agradezco a la Dra. Martha Yocupicio, por su asesoría y su paciencia.

**Agradezco a mis asesores:
Dra. Rosa María del Ángel y Dr. Mauricio Castañón Arreola**

Agradezco a mis compañeros y amigos de generación su apoyo en todo momento: Alma Villalobos, Alí Flores, Daniel Ortega, Diana López, Roberto Gamboa, Miguel Ángel Del Moral, Marco Muñiz y José Luis Villalpando.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por sus enseñanzas, trucos y sentido del humor: Roberto, Manuel, Carmen, Fernanda y Alín.

A todos mis compañeros del posgrado que de una u otra forma me acompañaron en esta aventura: Jacky, Brendi, Vivi, Katy, Lulu, Laura, Fonseca, Helios, Itzel Q., Itzel L., Alma Genis, Olga, Zelene, Rubí, Lidia, Arely, Alma, Claudia.

Agradezco al M. C. Eduardo Carrillo por su apoyo y gratas sesiones con el microscopio confocal y con la secuenciación de mis clonas.

Agradezco a todos los doctores del Posgrado en Ciencias Genómicas que me ayudaron en el desarrollo de mi formación: Dra. Mavil López, Dra. Elisa Azuara, Dr. Cesar Camarillo, Dra. Elizbeth Álvarez, Dra. Minerva Camacho, Dr. José Olivares, Dra. Selene Zárate, Dr. Humberto Nicolini, Dra. Sara Frías

Agradezco al Sr. Fernando Medina por su apoyo y enseñanza con el material biológico.

Agradezco a los chicos del CINVESTAV que me proporcionaron su ayuda, conocimientos, consejos y puntos de vista: Sofía, Henry, Margot, Clemente, Rebeca, Lupita y Gloria.

Agradezco a Carlos Manzo y Omar Maraschini

Agradezco tus pláticas y compañía Armando Rodríguez Rodríguez

Agradezco a mi mamá Gloria Rodríguez por su apoyo en todo y cuando digo todo es todo y por recordarme que para los sueños no hay edad.

Agradezco a mi papá Adolfo Gil su apoyo con el cuidado de mis hijos, mientras yo realizaba este proyecto.

Agradezco a mi hermana Zyania Gil por los diversos paros que me hizo durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mis hijos Rodrigo Manzo e Ian Luca Marashini por existir y gastar sus horas infantiles en el laboratorio conmigo, los amo.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	1
GLOSARIO	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
Epidemiología	6
Ciclo infeccioso	7
Manifestaciones clínicas	8
Virus dengue	9
MicroRNAs	11
Biogénesis de los miRNAs	12
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Cultivo celular	26
Virus e infección	26
Transfección de mimetizadores e inhibidores del hsa-miR-149*	26
Western blot	27
Inmunofluorescencia	28
Extractos de RNA totales y RNAs pequeños	28
RT-PCR y RT-PCR en tiempo real	29
RESULTADOS	32

Expresión de la proteína TGF- β en células Huh-7 no infectadas e infectadas con dengue	32
Expresión de LTBP3 de la vía de TGF- β , como blanco potencial del hsa-miR-149*, en células no infectadas e infectadas con dengue	38
Expresión de LTBP3, en células que sobreexpresan el hsa-miR-149*.....	44
Efecto del hsa-miR-149* en la eficiencia de infección con dengue	55
DISCUSIÓN	58
BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Genoma de virus Dengue

Fig. 2 Modelo simplificado del procesamiento y funciones de los miRNAs y siRNAs.

Fig. 3. Vía de señalización desencadenada por TGF- β .

Fig. 4. Esquema de la 3'UTR del RNAm de LTBP3.

Fig.5. Determinación cuantitativa del nivel de RNAm de TGF- β en células Huh-7 infectadas con virus dengue.

Fig. 6. Expresión de TGF- β en células Huh-7 infectadas con virus dengue mediante Western Blot.

Fig. 7. Detección de niveles de TGF- β en células Huh-7 infectadas con virus dengue mediante inmunofluorescencia.

Fig. 8. Determinación cuantitativa relativa del nivel de TGF- β en células infectadas con virus dengue por inmunofluorescencia..

Fig. 9. Expresión del RNAm de LTBP3 en células infectadas con virus dengue mediante RT-PCR en punto final.

Fig. 10. Determinación cuantitativa del nivel expresión del RNAm de LTBP3 en células Huh-7 infectadas con virus dengue.

Fig. 11. Detección de la proteína de LTBP3 en células Huh-7 infectadas con virus dengue mediante inmunofluorescencia.

Fig. 11. Detección de la proteína de LTBP3 en células Huh-7 infectadas con virus dengue mediante inmunofluorescencia.

Fig. 13. Expresión del hsa-miR-149* en células Huh-7 transfectadas con 30nM del precursor e inhibidor de dicho miRNA

Fig. 14. Expresión del hsa-miR-149* en células Huh-7 transfectadas con 50 y 100 nM del precursor e inhibidor de dicho miRNA.

Fig. 15. Expresión del RNAm de LTBP3 en células con sobreexpresión del hsa-miR-149* mediante RT-PCR en punto final.

Fig. 16. Determinación cuantitativa del nivel de expresión del RNAm de LTBP3 en células transfectadas con el hsa-miR-149*

Fig. 17. Nivel de expresión de la proteína LTBP3 en sobreexpresión del hsa-miR-149* en células Huh-7.

Fig. 18. Determinación cuantitativa relativa del nivel de LTBP3 en células mimetizadas con el hsa-miR-149* por inmunofluorescencia

Fig. 19. Nivel de expresión de la proteína LTBP3 en el mimetismo con el hsa-miR-149* e infección con virus dengue.

Fig. 20. Determinación cuantitativa relativa del nivel de LTBP3 en células mimetizadas con hsa-miR-149* e infectadas por virus dengue mediante inmunofluorescencia.

Fig. 21. Eficiencia replicativa del virus dengue en células que sobreexpresan el hsa-miR-149*.

Fig. 22. Eficiencia replicativa cuantitativa del virus dengue en células que sobreexpresan el hsa-miR-149*.

GLOSARIO

cDNA	DNA complementario
DENV	Virus Dengue
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHF	Fiebre por Dengue Hemorrágico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAp	DNA plasmídico
dNTPs	Deoxinucleótidos tri-fosfatos
DSS	Síndrome de Shock por Dengue
EDTA	Ácido etilén diaminotetra-acético
GADPH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
HPRT	Hipoxantine-guanin fosforibosil transferasa
HRP	Enzima Peroxidasa de Rabano
kb	kilobase
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria Bertoni
LTBP3	Proteína latente de unión al factor de crecimiento transformante beta - 3
mg	miligramos
microRNA	RNA pequeño de aprox. 19-21 nt
min.	minutos
miR	RNA pequeño de aprox. 19-21 nt
miRNA	RNA pequeño de aprox. 19-21 nt
mM	Milimolar
nM	nanomolar
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador de Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno

Pre 149*	Precursor hsa-miR-149*
Pre C	Precursor hsa-miR-Control
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
SSA	Secretaria de Salud
WB	Western blot

RESUMEN

La infección por virus modula una diversidad de procesos celulares mediante mecanismos que incluyen la regulación de la expresión genética a través de distintos procesos. Los miRNAs en general llevan a cabo sus efectos en la regulación postranscripcional mediante la degradación de los RNAm o el bloqueo traduccional siendo la función de uno de los miRNAs en la eficiencia replicativa del virus del dengue el objetivo del presente trabajo.

Uno de los miRNAs que se sobreexpresan tras la infección de la línea celular de hepatocitos humanos, Huh-7, es el hsa-miR-149* el cual se eleva aproximadamente 3 veces después de 24 h de infección con el virus dengue, por lo que primeramente se determinó mediante predicción *in silico* que diversas moléculas de la vía de TGF- β podrían inhibir su expresión siendo LTBP3 una molécula que participa en la inducción de dicha vía de señalización. Lo anterior tiene importancia adicional en el caso de la infección por el virus dengue debido a que se tienen estudios en los que se ha relacionado a dicha citocina con la severidad de la enfermedad.

Así, se planteó investigar el efecto que puede tener la infección en la vía de TGF- β , específicamente en la expresión de LTBP3 de tal manera que se determinó que tras la infección viral dicha citocina se encuentra disminuida, además se encontró que los niveles de expresión del RNAm de LTBP3 no cambian durante la infección. Sin embargo, la expresión de la proteína se encuentra disminuida a las 12, 24 y 48 h post-infección.

Como una manera de establecer el efecto de la sobreexpresión del hsa-miR-149* en la expresión de LTBP3 se llevaron a cabo ensayos de mimetismo de dicho miRNA y se determinó que la expresión del RNAm de LTBP3 sólo se encontró disminuido a las 12 h post-transfección, sin mostrar diferencias a las 24 y 48 h, sin embargo el nivel de expresión de dicha proteína disminuye a los tres tiempos estudiados después de la transfección. Por último, se determinó que la sobreexpresión del hsa-miR-149* disminuye la capacidad replicativa del virus dengue, por lo que sugiere que el miRNA estudiado podría funcionar respuesta antiviral en células hepáticas.

INTRODUCCIÓN

Los patógenos causantes de enfermedades en la población humana son muy diversos, dentro de éstos se encuentran los virus, los cuales pueden ser transmitidos por diferentes vías, de acuerdo al tipo y forma de infección. El virus del Dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* y es el causante de las enfermedades conocidas como fiebre por Dengue y Dengue hemorrágico. El virus del Dengue es transmitido por un vector artrópodo principalmente el mosquito *Aedes aegypti*; aunque otros miembros que pertenecen a este género también pueden actuar como vectores. A la fecha se han descrito 4 serotipos de este virus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.

EPIDEMIOLOGÍA

La fiebre por Dengue es una enfermedad de la cual se tienen registros desde hace varios siglos. En el siglo XVI (Henchal E., Putnak J.R. 1990) se reportaron afecciones que presentaban las primeras manifestaciones relacionadas con este tipo de padecimiento. Sin embargo es en el siglo pasado, cuando se comenzaron a reportar los estragos que puede ocasionar la infección por este flavivirus en las sociedades humanas alrededor del mundo (Stephenson J., 2005). Se calcula que anualmente se presentan de 50 a 100 millones de casos de enfermos por Dengue en el mundo (Stephenson J., 2005).

Los lugares donde la infección por virus dengue es más recurrente son aquellos donde el mosquito vector, *Aedes aegypti*, es endémico, principalmente de las zonas tropicales y subtropicales. Sin embargo la migración y facilidad de transporte de la población han propiciado que el mosquito portador del virus dengue y las enfermedades que produce se extiendan (Stephenson J., 2005). Cada año se reportan en diferentes partes del mundo alertas de epidemias por dengue. Se considera que de los casos reportados mundialmente, entre el 5 y 10% son causa de muerte (Stephenson J., 2005).

En México después de una extensa campaña para erradicar el mosquito realizada en 1960, se documentó una disminución temporal de los casos de

dengue. Sin embargo la campaña fue abandonada, lo cual ha propiciado que de 1978 a 2007, se hayan reportado hasta 20,000 casos de fiebre por dengue y en algunos años llegando hasta 50,000 casos (Falcón-Lezama J. y cols., 2009). En el 2011 el total de casos confirmados de dengue de 15,578 de los cuales 4608 son casos de DHF y solo se reportó aproximadamente el 0.1% de defunciones por este padecimiento (SSA, 2012).

CICLO INFECCIOSO

El ciclo infeccioso de Dengue comienza cuando el mosquito portador del virus Dengue, pica a un humano sano para alimentarse de tal manera que el virus es introducido vía sanguínea.

Se consideran tres ciclos infecciosos que involucran al virus Dengue: el primitivo, el rural y el urbano. En el primitivo o del bosque están involucrados primates inferiores y un mosquito conocido como canopy, donde el virus se mantiene de forma endémica. En el ciclo rural se involucran mosquitos de diferentes especies del género *Aedes*, los cuales infectan a humanos que viven en comunidades pequeñas, por lo que los individuos susceptibles se ven afectados, pero en su mayoría quedan inmunizados y la propagación del virus no es tan efectiva. En el caso del ciclo urbano, hay un gran impacto para la salud mundial y es donde se generan las epidemias ocasionadas por el virus Dengue (SSA, 2011).

El virus Dengue es transmitido principalmente por el mosquito hembra, la cual lo adquiere al alimentarse de un humano enfermo, llega al intestino donde éste se replica, pasa a la hemolinfa y de ahí es conducido a los diferentes órganos del insecto regresando a las glándulas salivales, donde se vuelve a replicar y por estos conductos el mosquito puede transmitir el virus al alimentarse de un individuo sano y de esta forma el ciclo infeccioso continua una y otra vez (Falcón-Lezama J. y cols., 2009)

El mosquito hembra es un insecto extremadamente sensible al movimiento, por lo cual al estarse alimentando de un individuo puede interrumpir repetidas veces el proceso. Este hecho causa que el mosquito regrese al mismo individuo o a un individuo diferente para seguir alimentándose, de tal manera que pica a varias personas durante su periodo

de alimentación, y en caso de que se trate de un mosquito infectado, puede transmitir el virus del Dengue a varias personas en poco tiempo. Es este comportamiento lo que hace que el mosquito sea un vector eficiente (SSA, 2011).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Después de que una persona es picada por el mosquito infectado con Dengue y el virus es transmitido, la enfermedad tiene un periodo de incubación de 4 a 14 días (SSA, 2011). Para muchas personas infectadas la enfermedad pasa desapercibida, ya que no presentan ninguna sintomatología. En el caso de la fiebre por Dengue, como su nombre lo indica se caracteriza por presentar elevadas temperaturas en un periodo de 3 a 7 días posteriores a la infección y puede estar acompañado por malestar general mialgia y artralgia, prurito, vómito, anorexia, cefalea, etc.

Normalmente la infección se resuelve de manera natural sin ninguna secuela posterior, sin embargo, en ocasiones la infección por virus Dengue llega a afectar la permeabilidad vascular del individuo causando leucopenias, principalmente neutropenias, lo que ocasiona hemorragias nasales, dérmicas, vómito con sangre, etc. A éste síndrome se le conoce como Dengue Hemorrágico (DHF) que puede llegar a ser mortal, debido los cambios en la permeabilidad vascular pueden ser graves. Además se puede desarrollar Síndrome de Shock por Dengue (DSS) caracterizado por colapso del organismo ocasionado principalmente por hemoconcentración.

Aún no existe un tratamiento efectivo contra la infección por Dengue, pero afortunadamente en el caso de la fiebre por Dengue el organismo lo resuelve de manera natural y los tratamientos solo son para disminuir las molestias que ocasiona la patología provocada por este virus. Hasta el momento, no es claro porque unos individuos tienen dengue clásico y otros dengue hemorrágico sin embargo, se ha observado que la severidad de la enfermedad está relacionada con diversos factores virales y del huésped como edad, elementos genéticos, así como el número de exposiciones o infecciones con los distintos serotipos del virus Dengue (Falcón-Lezama J. y cols., 2009).

VIRUS DENGUE

Se ha mencionado de manera reiterada que el virus Dengue es causante de epidemias, que han mermado poblaciones a lo largo de la historia de la humanidad. Este patógeno que pertenece a la familia *Flaviviridae*, a la cual pertenecen otros patógenos importantes como el virus de la fiebre amarilla y el virus de la encefalitis japonesa, y el virus de la hepatitis C (Falcón-Lezama J. y cols., 2009).

El virus Dengue está constituido por un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, rodeado por una nucleocápside de forma icosaédrica de alrededor de 30 nm de diámetro formada por la proteína viral de la cápside C, la cual está cubierta una bicapa lipídica haciendo del virus maduro una partícula alrededor de 50 nm de diámetro (Henchal E., Putnak J.R., 1990).

El virus hace contacto con la superficie celular e infecta a través de la proteína E, la cual es reconocida por la célula por medio de receptores. La entrada del virus se lleva a cabo de manera por endocitosis mediada por clatrina y ya dentro del endosoma, cuando el pH desciende, las membranas virales y endosomales se fusionan (Knipe D.M., Howley P.M., 2010), liberando el genoma viral al citoplasma, en donde comienzas los procesos de traducción y replicación en las membranas del retículo endoplásmico rugoso. (Knipe D.M., Howley P.M., 2010).

El genoma del virus codifica para 3 proteínas estructurales conocidas como: proteína C, prM y E, las cuales conforman la partícula viral. Así también codifica para 7 proteínas no estructurales, conocidas como: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B Y NS5, las cuales participan en la replicación viral (Knipe D.M., Howley P.M., 2010). El genoma tiene una estructura cap en el extremo 5' y carece de cola poli(A), Las regiones no traducidas (UTR) ubicadas hacia los extremos 5' y 3' del genoma viral se ha descrito que forman estructuras secundarias de tallo y burbuja, regulan una serie de funciones en el virus (Filomatori C. V., Gamarnik . A.V., 2009) (Fig. 1).

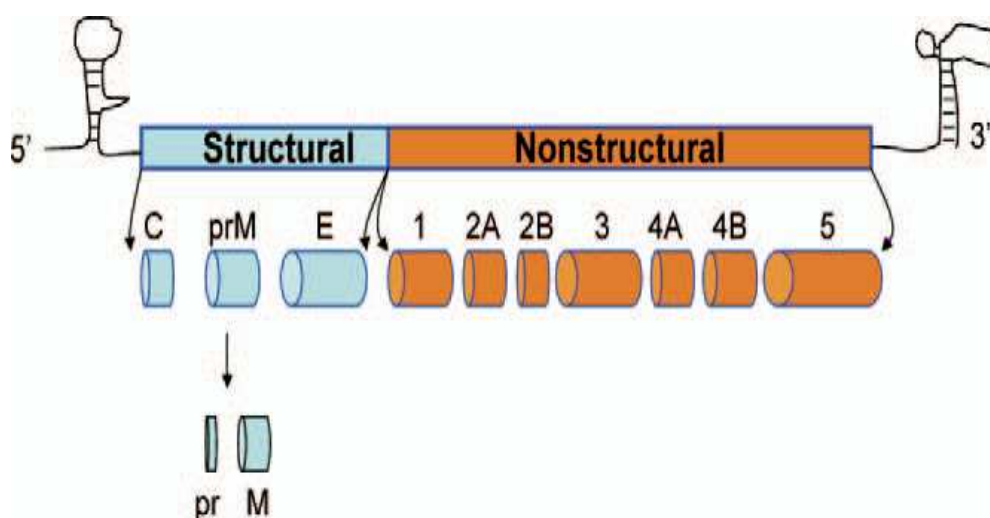


Fig.1, Genoma del virus Dengue. El genoma es de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva hacia los extremos esta franqueado por dos regiones UTRs 3' y 5'. Está constituido por 3 proteínas estructurales, marcadas en azul, las cuales conformaran al virion y 7 proteínas no estructurales marcadas en color rojo, las cuales participan en la replicación viral. El genoma viral es traducido en una poli-proteína, el cual es procesado por proteasas virales NS2B-NS3, en conjunto con proteasas celulares. El genoma mide aproximadamente 11Kb.

Una vez expuesto el genoma viral en citoplasma de la célula huésped comienza su traducción a través de la maquinaria celular, generando una poliproteína. De manera co-traducciona este polipéptido es procesado por proteasas celulares y virales como la NS3-NS2B para generar las proteínas virales maduras (Assenberg, R., y cols., 2009). La proteína C que forma la cápside se traduce primero exponiendo el sitio de corte que realiza la serin proteasa viral NS3, y luego un péptido señalizador para su asociación con el retículo endoplásmico. De la poliproteína también se generan a las proteínas no estructurales, entre las que se encuentran la RNA polimerasa dependiente de RNA llamada NS5, la cual transcribe el genoma, formando un RNA de polaridad negativa, que servirá de molde para la síntesis del genoma viral de la progenie de polaridad positiva. Una vez replicado el genoma, éste se asocia a la proteína viral C, la cual se encuentra en el retículo endoplásmico rugoso, donde ocurre la internalización del genoma, el ensamble y la formación del virion ocurren en estrecha asociación con las membranas internas celulares en el lumen del retículo endoplasmático. Para finalizar la proteína E del virion sufre glicosilaciones en el aparato de golgi y procesamiento de la proteína prM para dar lugar al virion maduro y a través de exocitosis ser expulsado de la célula y continua el establecimiento de la infección (Knipe D.M., Howley P.M., 2010).

microRNAs

Las infecciones virales inducen una gran cantidad de cambios en el metabolismo celular para permitir la multiplicación viral. Uno de los mecanismos que se ven afectados es la regulación de la expresión genética. Hace 2 décadas se descubrió que además de diversos factores proteicos reguladores, también existían pequeñas moléculas de RNA, capaces de regular la expresión genética a nivel post-transcripcional. Estos pequeños RNA son conocidos como microRNA (miRNA) éstos se han visto involucrados en la regulación de diversos procesos celulares como el desarrollo, diferenciación, muerte y el metabolismo celular (Davis B. N., Hata A., 2009).

Los miRNAs o microRNAs están constituidos por 20-30 nucleótidos y sus efectos se observan como inhibición o silenciamiento de la expresión génica, a través de un apareamiento de bases con el RNAm del gen blanco

(Carthew R. W, Sontheimer E. J., 2009). Los miRNAs se descubrieron en *C. elegans* y el primer miRNA descrito se denominó lin4, el cual se caracteriza por su capacidad de regular el ciclo de vida de este organismo (Noren Hooten, N y cols. 2010). Posteriormente se pudo observar este tipo de reguladores en plantas, artrópodos, mamíferos, etc.

Los miRNAs se transcriben en la célula de forma constitutiva o bien se pueden inducir bajo diversos estímulos de tal manera que muchos de ellos son tejido específico (Perron M. P., Provost P., 2010). Uno de los estímulos que inducen la expresión diferenciada de los miRNAs es el estrés el cual puede deberse a diversos factores como por ejemplo la infección por agentes patógenos.

BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs

Se postula que al menos el 60% de las proteínas que codifica la célula son reguladas por miRNAs (Davis B. N., Hata A., 2009). El proceso de síntesis inicia en el núcleo con la transcripción del RNAm mediante la RNA polimerasa II, formando lo que se conoce como miRNA primario (pri-miRNA). El pri-miRNA se caracteriza por formar estructuras secundarias de tallo y burbuja, las cuales posteriormente son reconocidas por una RNasa III denominada DROSHA y su cofactor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical región gene 8), que forman un complejo proteico llamado microprocesador. Dicho complejo corta al pri-miRNA, de lo cual resulta un RNA de aproximadamente 70 nt de longitud que conserva la estructura de horquilla, dando lugar al pre-miRNA. El miRNA precursor es transportado del núcleo al citoplasma por la exportina-5, la cual es un miembro de la familia Ran (Narry Kim V., 2005).

Una vez en el citoplasma el pre-miRNA es reconocido y procesado por otra enzima RNasa III citoplasmática llamada DICER, la cual al cortar la estructura de burbuja genera los miRNAs maduros de doble cadena (Shomron S., Levy C., 2009), de aproximadamente 20 nts de longitud. La proteína DICER contiene un dominio de helicasa, un dominio DUF283 (dominio de reconocimiento del miRNA), un dominio PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), dos dominios RNasa III y un dominio de unión para RNAs de doble cadena (dsRBD). A través de su dominio PAZ, esta enzima reconoce los cortes

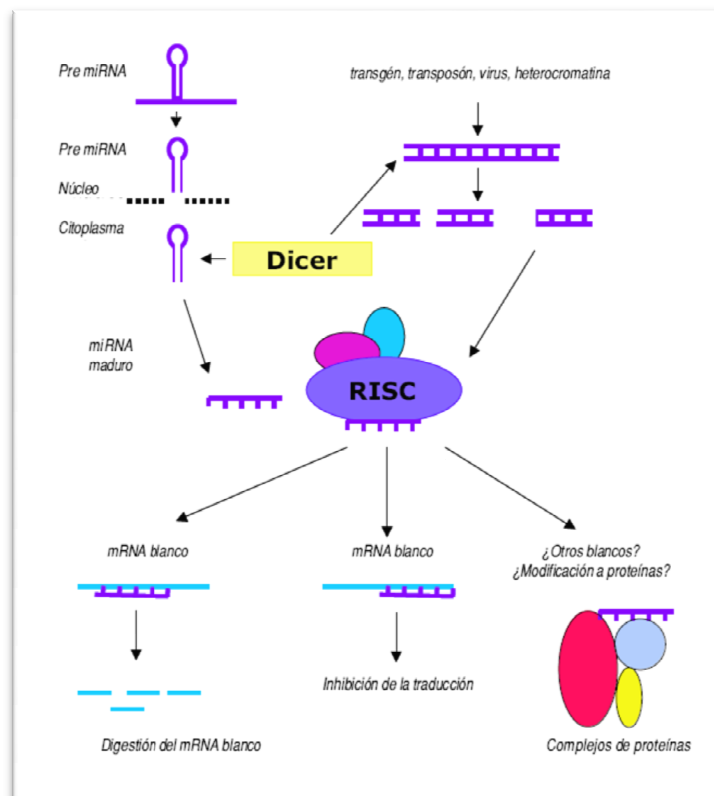
realizados por DROSHA y esto facilita el procesamiento del miRNA (Shomron S., Levy C. 2009).

El RNA dúplex se mantiene unido a DICER de manera que cuando ésta se libera se separan las cadenas del miRNA, y una de las cadenas es reconocida por el complejo RISC (del inglés RNA-induced silencing complex).

RISC está formado por ribonucleoproteínas de la familia de las argonautas (Ago) con dominios PAZ-Piwi (Vazquez-Ortiz G. y cols. 2006). Estos dominios ayudan a reconocer y si es el caso a cortar el RNAm blanco. El complejo RISC en conjunto con el miRNA, encuentran a su RNAm blanco y de esta manera al producirse un grado de complementariedad se realiza la función del miRNA que es la de inhibición de la traducción y/o degradación del mRNA.

El complejo miRNA-RISC reconoce a su RNAm blanco mediante su acoplamiento hacia el extremo 3'UTR por complementariedad imperfecta y la interacción se da en una región de 2-8 nucleótidos denominada región semilla, que es donde la complementariedad es alta (Carthew R. W, Sontheimer E. J., 2009). Al reconocer el sitio, el complejo miRNA-RISC, compete por éste con el factor de inicio de la traducción, lo que impide que la traducción se realice (Gu S., Kay M. A., 2010).

Sin embargo debido al porcentaje de complementariedad, el dominio Ago 2 en algunos organismos como las plantas, es capaz de cortar el RNAm blanco y posteriormente degradarlo, esto sucede principalmente cuando la región semilla del miRNA y el RNAm se complementan en un 100% (Pillai R. S., 2005). Cuando la complementariedad es incompleta se forman estructuras de tipo horquilla pequeñas, así el complejo RISC-miRNA no se acopla tan específicamente y solo se produce una inhibición de la traducción. En algunos casos el RNAm acoplado con el miRNA es transportado a las zonas denominadas cuerpos P donde se arresta al RNAm y se inhibe la traducción del mismo, ya en este sitio se puede liberar el RNAm para su traducción o puede ser degradado.



As y siRNAs.
 lado derecho.
 os al complejo
 na pasajera o
 dena sencilla
 gradación del
 participan en

Algunos estudios muestran que la proteína GW182 participa en el secuestro de los RNAm junto con el complejo RISC hacia los cuerpos P, donde se degrada el RNAm, mediante la acción de proteínas que se encuentran en estas regiones celulares como la proteína Xrn1, Dcp1, Lsm o simplemente mantiene al RNAm y arresta su traducción (Pillai R.S., 2005).

ANTECEDENTES

Los miRNAs tienen una función específica en el metabolismo celular, sin embargo se ha visto que cuando algún patógeno infecta a la célula, algunos miRNAs cambian su nivel de expresión e influyen de diversas formas, pueden favorecer la infección o ayudar a la célula a defenderse de dicho patógeno. Además algunos virus son capaces de expresar sus propios miRNAs y otros de inducir o inhibir ciertos miRNAs. Sin embargo, aún es mucho lo que se desconoce sobre los mecanismos que se inducen durante infección y lo que estos cambios generan en la respuesta celular a este estímulo (Wu Z. y cols., 2009).

Datos recientes muestran que los virus han desarrollado estrategias para prevenir que las células infectadas sufran apoptosis y evadir la respuesta inmune innata y adaptativa mediante la modulación de la expresión de miRNAs celulares como ocurre en la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV) (Chable-Bessia C. y cols., 2009) por el virus de la Hepatitis B (HBV) (Liu Y y cols., 2009), entre otros.

En investigaciones realizadas con líneas celulares infectadas con HBV, se logró observar que once miRNAs: miR-181, miR-196b, miR-181c, miR-181d, miR-183, miR-429, miR-200b, miR-99b, miR-23a, miR-125a y miR146, elevaron su expresión, mientras que siete miRNAs miR-15a, miR-378, miR-16, miR-338, miR-422a, miR-17 y miR-202 significativamente disminuyeron su expresión (Liu Y. y cols., 2009).

Tanto el miR-15a como el miR16 reducen su nivel de expresión tras la infección con HBV. Estos miRNAs tienen como blancos al oncogén c-myc y la proteína FGF2 (proteína inductora de vasos sanguíneos), cuya expresión se ha reportado como significativamente alta en ratones con tumores hepáticos (Niepmann M., 2009). Por tanto, es muy probable que la expresión anormal del miR-15a y miR-16 puedan influir en el proceso de tumorigénesis en la infección causada por HBV.

En muchos casos la infección por HBV conlleva el desarrollo de hepatocarcinomas, por lo que el seguimiento de estos miRNAs nos amplía el panorama de la regulación anormal de los oncogenes lo cual propicia la

proliferación celular descontrolada. Algunos de los miRNAs desempeñan funciones importantes, en las células infectadas con HBV, como son la regulación de las diferentes vías de señalización que favorecen o no al virus (Niepmann M, 2009 Landgraf P. y cols., 2007).

En la infección con HIV, se ha visto la sobreexpresión el miR-29, es capaz de silenciar a la proteína viral Nef (Ahluwalia J.K. y cols., 2008, Nathans R. y cols., 2009), la cual se encarga de que la replicación viral se lleve a cabo eficientemente (Chable-Bessia C y cols., 2009 Ghosh Z. y cols., 2009 Nathans R. y cols., 2009). Por ejemplo, dicha proteína es capaz de ejercer regulación negativa de los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad a nivel de la superficie de la célula infectada, contribuyendo así a los mecanismos de persistencia y de evasión de la respuesta inmune del virus (Nathans R. y cols., 2009). El fenotipo asociado a Nef que mejor se ha caracterizado es la disminución de los niveles del receptor CD4 (Ghosh Z. y cols., 2009). Por lo tanto, al haber sobreexpresión del miR-29, la presencia de Nef disminuye y de esta forma la célula lleva a cabo un mecanismo más de defensa contra este tipo de infección viral.

En la infección con el virus de la Influenza se ha determinado que los miR-507 y miR-136 tienen blancos en secuencias del genoma viral, para que de esta manera se evite que la infección se establezca y así ayudar al organismo a combatir la infección. Se ha postulado que los sitios de unión de dichos miRNAs están en la región que codifica para la polimerasa B2 (PB2) y la hemaglutinina (HA), las cuales son muy importantes en la patogenicidad del virus. La glicoproteína HA es una molécula de superficie implicada en la unión directa del virus a la superficie celular, mientras PB2 es uno de los tres componentes de la ribonucleoproteína responsable de replicación y transcripción del genoma viral (Scaria V. y cols., 2006).

Como hemos podido observar la regulación de los miRNAs en las infecciones virales actúa de diferentes maneras, ya sea que su expresión inhiba o promueva la infección.

En nuestro laboratorio se realizaron microarreglos de miRNAs utilizando los extractos de una línea celular hepática denominada Huh-7 no infectada e infectada con el virus dengue, donde se detectó que los patrones de expresión de algunos miRNAs se modifican por la infección. El ensayo de microarreglo

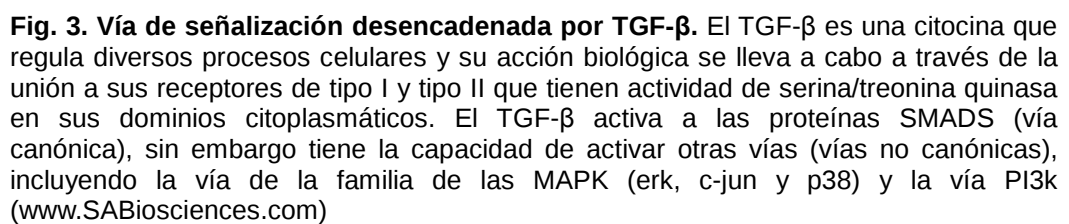
dio como resultado que 8 miRNAs muestran una expresión diferencial en respuesta a infección con el virus dengue. Posteriormente se realizaron análisis bioinformáticos en los cuales se determinaron mediante diversas bases de datos, los blancos hipotéticos de los miRNAs modulados. La mitad de estos miRNAs tienen blancos hipotéticos relacionados con la vía del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), lo cual es interesante debido a que como se ha descrito anteriormente, dicha citocina se ha relacionado con una respuesta inmune diferencial en los diferentes cuadros infecciosos que se desarrollan en el humano tras la infección con el virus dengue (Scaria V. y cols., 2006).

Es a partir de estas evidencias experimentales que se propuso estudiar el papel que los miRNAs modificados durante la infección con dengue en la regulación de la expresión de moléculas importantes en la respuesta de la vía de señalización inducida por TGF- β .

TGF- β es una citocina con diversas funciones en diferentes procesos celulares, tales como: diferenciación, crecimiento, migración, apoptosis y respuesta inmune entre otros (Ghosh Z. y cols., 2009).

Existen 3 isoformas de TGF- β (1-3) en mamíferos (Scaria V. y cols., 2006), aunque las variaciones son muy sutiles, cada una desarrolla y participa en distintos procesos celulares (Ghosh Z. y cols., 2009).

TGF- β es secretada en forma de complejo con la proteína latente (LAP) y la proteína latente de unión a TGF- β (LTBP), la señalización se activa al unirse a su receptor correspondiente (Scaria V. y cols., 2006). La proteína precursora está conformada por aproximadamente 400 aminoácidos y son los 112 residuos localizados en el extremo carboxilo terminal los que constituyen la forma madura. Los residuos restantes, localizados en la porción amino-terminal, constituyen el llamado péptido asociado de latencia o simplemente LAP, por sus siglas en inglés (latency associated peptide) (Lin E.A. y cols., 2010).



TGF- β se une a un complejo heterodimérico que conforma el receptor, que contiene subunidades de tipo serin-treonin cinasas. Los receptores más conocidos que participan en la respuesta a TGF- β son los ALK (activin-like receptor kinase) (Klu R, Hesketh R., 2000). La activación y fosforilación de ALK, enciende la respuesta de la ruta de señalización de las proteínas Smads (Penttinen C. y cols., 2002). Después de la activación de ALK, se fosforilan Smad 2 y 3, éstas a su vez activan Smad 4 mediante fosforilación y así se transportan al núcleo donde regulan la transcripción de diversos genes blancos (Unsöld U. y cols., 2000).

Como parte de la ruta de señalización, la proteína Smad 7 inhibe y regula la respuesta por TGF- β (Annes J.P. y cols., 2003). Se postula que este efecto se lleva a cabo, cuando Smad 7 compite por el sitio de unión y activación del receptor ALK, sin embargo, también se ha propuesto que Smad7 promueve la ubiquitinización de ALK para ser degradado vía proteosoma (Marek A. y cols., 2002).

Otra vías de señalización mediadas por TGF- β involucran la respuesta con las proteínas Ras-ERK, Rho-Rac-cdc42 MAPK, TAK-Mkk3/6-p38, etc (Dogar A.M. y cols., 2011).

Estudios previos han demostrado que la expresión de TGF- β en suero de pacientes que presentan DHF es significativamente mayor que la detectada en los que sufrían Dengue clásico (Djamiatun K. y cols., 2011 Agarwal R. y cols., 1999).

Lo anterior nos permite proponer que TGF- β podría considerarse como un marcador para de la gravedad causada por la infección con dengue.

En estudios recientes se ha demostrado la modulación de TGF- β en respuesta a la inducción o silenciamiento de algunos miRNAs, los cuales tienen como RNAm blancos involucrados en la vía de dicha citocina, lo cual influye en procesos celulares como apoptosis, respuesta inmune, proliferación celular, etc. (Kim S. y cols. 2011, [Dogar A.M](#) 2011).

Entre los miRNAs que presentaron una expresión diferencial en la infección por Dengue, se encuentra el hsa-miR-149*, el cual tiene diversos blancos hipotéticos y podría estar involucrado en muchas funciones y vías celulares.

En las evidencias experimentales que se tienen de la función del hsa-miR-149*, es que se ha demostrado que algunos de sus blancos están involucrados con la apoptosis. En dicho estudio se logró determinar que la expresión del hsa-miR-149* disminuye la cantidad de los RNAm que codifican para Akt1 y E2F1 y de esta manera se inhibe su expresión en una línea celular de neuroblastoma (Ruey-Jen L. y cols., 2010). Este dato podría implicar que en el caso del dengue, la célula responde sobreexpresando un miRNA, para contrarrestar la proliferación celular.

Los análisis *in silico* de los RNAm que podrían interaccionar con el hsa-miR-149*, han determinado que la proteína de unión latente de TGF- β 3 (LTBP3) podría modificar su expresión al aumentar la expresión de dicho RNA pequeño, y este hecho podría relacionarse con la disminución en la activación de TGF- β (Fig. 4).

La proteína conocida como proteína de unión latente de TGF- β (LTBP) forma parte del complejo necesario para la formación y activación de TGF- β . Existen 4 isoformas de la proteína LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4 (Klu R, Hesketh R., 2000). LTBP3 es una proteína cuyo peso molecular va de 125 a 240 kDa, contiene motivos de repetidos de 8-cisteínas y de repetidos del tipo factores de crecimiento epidermal (EGF-like) (Penttinen C y cols., 2002). En el tercer dominio de repetidos de 8 cisteínas es donde LTBP3 forma puentes disulfuro con TGF- β conformando así un complejo que contiene el péptido señal (LAP), TGF- β y LTBP3. Este complejo será disuelto para la liberación y activación de la cascada de señalización que produce TGF- β (Klu R, Hesketh R., 2000). La liberación del complejo se ha visto que puede responder a diversos activadores como la metaloproteasa 9, la plasmidina, entre otros (Annes J.P. y cols., 2003).

Por lo anterior se considera que LTBP3 es importante para la regulación de la respuesta inmune ocasionando inflamación prolongada o proliferación descontrolada de las células (Marek A. y cols. 2002).

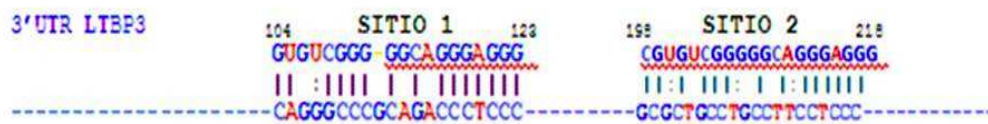


Fig. 4. Esquema de la 3'UTR del RNAm de LTBP3. La 3'UTR del RNAm de LTBP3 consta de 274 nts, contiene 2 sitios de interacción para el hsa-miR-149*, el sitio 1 comprende del nt 104 al 123 y su región semilla del nt 117 al 123 y el sitio 2 del nt 197 al 218 y su región semilla del nt 212 al 218 (www.MicroCosmTarget.com).

JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo de investigación tiene interés en el estudio de la relación que existe entre la infección con virus dengue y los miRNAs como moléculas reguladoras de la expresión genética; siendo el virus del dengue el agente causante de un alto índice de morbilidad de tal manera que representa un problema de salud público en México y en el mundo. Además existen antecedentes enfocados en diferentes enfermedades virales donde la desregulación de los miRNAs afecta a diferentes vías de señalización de la célula.

En los estudios realizados en nuestro laboratorio se observó que el hsa-miR-149*, tiene diversidad de RNAm blancos celulares, muchos de estos involucrados en una vía importante para la respuesta inmune: la vía de TGF- β , la cual se ha relacionado con la severidad de la enfermedad producida por el virus dengue.

Por lo tanto consideramos que demostrar la participación del hsa-miR-149* en la modulación de una de las vías de señalización más importantes en la respuesta inmune innata contra el virus dengue como es la de TGF- β sería de gran utilidad tanto para el conocimiento de la relación huésped parásito como para la posible aplicación en terapias antivirales alternativas

HIPÓTESIS

El hsa-miR-149* de una línea celular de hepatocitos humanos que cambia su expresión en las células infectadas con el virus dengue interacciona con blancos celulares como LTBP3 y modula la capacidad de replicación viral.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del hsa-miR-149* en la respuesta mediada por la vía de TGF- β ante la infección por dengue.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el efecto de la infección con el virus dengue en la expresión de TGF- β .
- Determinar el nivel de expresión de la proteína LTBP3 de la vía de TGF- β como blanco potencial del hsa-miR-149* en células no infectadas e infectadas por dengue.
- Determinar el efecto de la expresión del gen LTBP3 mediada por hsa-miR-149* y el efecto de dicho miRNA en la infección por dengue.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Las células Huh-7, son una línea celular de hepatocarcinoma, se cultivaron en atmosfera con CO₂ al 5% a 37°C en medio Advanced DMEM (Invitrogen USA) completo, 5% SBF (Suero fetal bovino), glutamina (200mM) y penicilina (1x10⁵ U/L).

VIRUS E INFECCIÓN

La cepa de DENV-2 (Nueva Guinea C), la cual se propagó en el cerebro de ratones neonatos, los cuales fueron extraídos después de 5 días de infección, se maceraron en medio Hanks (Invitrogen USA) mediante el paso del tejido por agujas de diferente calibre para obtener un homogenizado que se centrifuga por 15 min a 13,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se vuelve a centrifugar de la misma manera. Por último, el sobrenadante ya clarificado se filtra a través de una membrana con un poro de 0.22 µM, se almaceno en alícuotas y se guardaron a -80°C hasta su uso. El título de los extractos virales se determina mediante la técnica de plaqueo en monocapa de células BHK-21.

Los ensayos de infección se realizaron incubando las células Huh-7 con el extracto de DENV-2 por 2 h a una MOI de 3 a 37°C en medio DMEM sin antibióticos. A continuación se retiró el medio y se añadió medio DMEM completo para permitir que continuara la infección por los tiempos requeridos para cada ensayo.

TRANSFECCIÓN DE MIMETIZADORES E INHIBIDORES DEL hsa-miR-149*

Las células Huh-7 se sembraron en placas 12 ó 24 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%, se transfectaron mediante lipotransfección con los mimetizadores o inhibidores del hsa-miR-149* (Applied Biosystems). Para ello se utilizo una mezcla del reactivo siPORT Amine (Ambion) y 30, 50 ó 100 nM

de mimetizadores o inhibidores, la mezcla se incubó por 10 min a TA y se agregó a la monocapa de células para finalmente cosechar o fijar las células a los tiempos de 12, 24 y 48 h o bien llevar a cabo la infección viral.

WESTERN BLOT

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 6 pozos, las cuales se infectaron o no con DENV-2 a una MOI de 3, con medio sin SFB y sin antibióticos. A las 24 h post-infección se realizó la extracción de proteínas totales de la siguiente manera: se lavaron las células con 2 ml de PBS frío (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, para un concentrado a 10X), posteriormente se trataron con amortiguador de despegado (Tris-HCl 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM), se recuperaron en tubos cónicos de 15ml y se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla celular, se lavó con PBS y se centrifugó una vez más bajo las mismas condiciones, se resuspendieron en 250 µl de amortiguador de lisis (HEPES 10 mM a pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM) con inhibidor de proteasas (Complete, Roche) y se incubaron en hielo por 20 min. Las células se sonicaron por 30 s con intervalos de 10 s y por último se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se alicuotó y se guardó a -80°C hasta su uso. El extracto total de proteínas se cuantificó por el método de Bradford. 100 µg del extracto proteico se separaron en geles de SDS-PAGE al 12% que se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa la cual se bloqueó con una solución de PBS-leche semidescremada al 10% por 2 h a temperatura ambiente (TA) y se incubó con el anticuerpo primario de conejo Anti-TGF-β1 (Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. SC-146) en PBS-SFB al 3% a 4°C toda la noche. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-Tritón al 0.5% por 5 min y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP (Jackson ImmunoResearch) por 1 h a TA para luego realizar los lavados de la manera descrita anteriormente. Finalmente se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Femto (Thermo scientific). Como control de carga se realizó la detección de la proteína GAPDH

utilizando el anticuerpo de ratón anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. SC-166574) y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón acoplado a HRP (Jackson ImmunoResearch).

INMUNOFLUORESCENCIA

Las células Huh-7 se sembraron sobre cubreobjetos de 13 mm de diámetro en placas de 24 pozos, después de la infección o del tratamiento de transfección se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS, se incubó durante 20 min se permeabilizaron con acetona fría por 2 min, se realizó un lavado con PBS para proceder al bloqueo utilizando 50 µl de PBS-SFB al 10% por 2 h. Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-TGF- β o anti-LTBP3 (Santa Cruz Biotechnology No. Cat. SC-98276) diluidos en PBS-SFB al 3% a 4°C toda la noche, transcurrido este tiempo se realizaron 5 lavados de 5 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch) por 1 h a TA en ausencia de luz. Se realizaron 5 lavados adicionales con PBS y finalmente se contratiñeron los núcleos con DAPI-vectashield (Vector Laboratories) y se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2).

EXTRACTOS DE RNA TOTAL Y RNA PEQUEÑOS

Las células Huh-7 se lavaron con PBS y se incubaron con Trizol (Invitrogen USA) por 5 min, se homogenizaron con pipeta y se agregó el 20% de volumen de cloroformo; se mezcló y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se agregó cloroformo en una relación de volumen de 1:1, se incubó 30 min a -20°C, se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C, se resuspende en agua libre de nucleasas y se almacena a -80°C hasta su uso.

Para la extracción de RNAs pequeños se sigue el protocolo recomendado por Ambion para el kit mirVana. Las células Huh-7 se sembraron en placas de 12 pozos y posterior al tratamiento a que se hayan sometido se retiró el medio de cultivo y se agregaron 600 µl de la solución de lisis, se tomó el lisado, se agregó 60 µl del aditivo homogenizador y se incubó por 10 min en hielo. Se adicionó 600 µl de fenol-cloroformo, se mezcló con vortex y se centrifugó a 10,000 g por 5 min a TA, se recuperó la fase acuosa y se agregó un 1/3 de vol. de etanol al 100% y se mezcló nuevamente con vortex. La mezcla anterior se pasó por la columna proporcionada en el kit, se centrifugó por 15 s y a la fracción eluída se añadió 2/3 del volumen de etanol al 100%, se mezcló y se pasó a través de una segunda columna la cual bajo estas condiciones retiene los RNAs pequeños, los cuales se eluyen adicionando 100 µl de agua libre de nucleasas y se guarda a -80°C.

La integridad de los RNAs se verifica usando una alícuota del extracto el cual se separa en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La cuantificación del RNA contenido en los extractos se determinó por espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo scientific).

RT-PCR y RT-PCR EN TIEMPO REAL

300-500 ng de extracto de RNA se trataron con 1 µl DNAsa (New England Biolabs, 1 U/µg) y se incubó a 37°C por 15 min, posteriormente se agregó 1 µl de EDTA (25 mM) por 5 min a 70°C para inactivar la DNAsa. Posteriormente el RNA tratado se utilizó para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción adicionando al extracto oligo dT o hexámeros al azar (Applied Biosystems), se incubó a 70°C por 5 min, se colocó en hielo y se agregó una mezcla de amortiguador de reacción, 2.4 µl MgCl₂ 25 mM, 10 mM cada dNTP, 1 µl de enzima RT Improm-II (Promega) y agua libre de nucleasa para completar 20 µl. La mezcla anterior se incubó por 5 min a 25°C, luego 60 min a 42°C y 15 min a 70°C.

Una vez obtenido el cDNA se utilizaron 2 μ l de éste para preparar la reacción de PCR a la cual se agregaron 12.5 μ l de KAPA2G Fast HotStart ready mix 2X (Kappa Biosystems) y el iniciador sentido y antisentido y se completa a 25 μ l con agua de ampolla. La mezcla se incubó a 95°C por 1 min, 40 ciclos de 95°C por 10 s, T_m del par de iniciadores por 10 s y 72°C por 1 s, finalmente un ciclo de 72°C por 30 s. Cabe mencionar que en el caso de las reacciones de PCR en tiempo real se agregan 1.25 μ l de Eva Green 20X (Biotium) a la mezcla y el termociclador se programa para realizar 1 ciclo de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 30s, T_m del par de iniciadores por 30 s y 72°C por 30 s y una etapa final de disociación de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min.

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real para amplificar el RNAm de TGF- β 1 se llevaron a cabo mediante sondas Taqman (Applied Biosystems) para lo cual se utilizaron 2 μ l del cDNA que se obtuvo de la manera previamente descrita. Se agregaron 10 μ l de la mezcla Taqman Universal PCR 2x, 1 μ l de la sonda Taqman Assay 20x y agua estéril para alcanzar un volumen de 20 μ l. El termociclador se programó para realizar 1 ciclo de 50°C por 2 min y 95°C por 10 min y después 40 ciclos de 92°C por 15 s y 60°C por 1 min. Como control de carga de este tipo de reacciones se utilizó la sonda taqman de HPRT. La cuantificación relativa se determinó con el análisis de los resultados mediante el método de $\Delta\Delta C_t$.

Una vez obtenida la fracción correspondiente a los RNAs pequeños se llevó a cabo la reacción de RT-PCR para el hsa-miR-149* para lo cual se utilizaron 2.5 μ l de la fracción de RNAs pequeños (1-10 ng), el kit de TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) donde se agregó 10 mM de cada dNTP, 0.5 μ l de MultiScribeTM Reverse Transcriptase (50 U/ μ l), Reverse Transcription amortiguador 10x, 0.095 μ l de RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1.5 μ l de primer hsa-miR-149* y se completa con agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 20 μ l. Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción se programó el termociclador con 1 ciclo de 16°C por 30 min, 42°C por 30min y finalmente 85°C por 5 min.

Gen	Secuencia	Posición	Amplicón
DENV (NS5) Sentido	5'-TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAA-3'	8993	266 pb
DENV (NS5) Antisentido	5'-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3'	9258	
3'UTR LTBP3 Sentido	5'-ATATAAAGCTTCTCGGCCAGACCTCGGTATCA-3'	4053	274 pb
3' UTR LTBP3 Antisentido	5'-TATAGAGAACTAGTACGATCTGATTATCAGTTTCT-3'	4289	
HPRT Sentido	5'-GATGGTCAAGGTCGCAAGCTT-3'	635	114 pb
HPRT Antisentido	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAACTT-3'	723	

Los nucleótidos subrayados corresponden a la secuencia de las enzimas de restricción Spe I y Hind III.

Posteriormente se tomó 1.33 µl del producto de la reacción de RT para llevar a cabo la reacción de PCR para de tiempo real, se tomó 1µl de sonda pre-hsa-miR-149* TaqMan MicroRNA Assay 20x, 10 µl de la mezcla TaqMan 2x Universal PCR Master y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 50°C por 2 min y 95°C por 10 min, después 40 ciclos de 92°C por 15 s y 60°C por 1 min. La cuantificación relativa se determinó con el análisis de resultados mediante el método de $\Delta\Delta C_t$. La normalización de la carga se llevó a cabo utilizando la sonda TaqMan para el RNA pequeño U6 (Applied Biosystems).

RESULTADOS

Expresión de la proteína TGF- β en células Huh-7 no infectadas e infectadas con dengue

El propósito principal de este trabajo fue el análisis de la expresión de moléculas involucradas en la vía de TGF- β , así se llevó a cabo la determinación del nivel de expresión de dicha molécula en las células no infectadas e infectadas.

El nivel de expresión del RNAm de TGF- β en células Huh-7 no infectadas e infectadas con DENV-2 a una MOI de 3 a las 12, 24 y 48 h post-infección, se determinó mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman. Los resultados muestran que a los tres tiempos post-infección monitoreados no existen diferencias significativas en la expresión del RNAm de TGF- β , sin embargo se observa una tendencia a la disminución de los niveles de dicha molécula en todos los tiempos (Fig. 5).

Además de determinar la cantidad de RNAm, también se midió la concentración de la proteína TGF- β a las 24 h post-infección mediante ensayos de western blot a las 24 h post-infección. El peso molecular descrito para TGF- β es de 12.5 kDa y como se puede observar en la Fig. 6 su expresión disminuye en los extractos de células infectadas en comparación con las células no infectadas. El control de carga utilizado fue GAPDH, el cual también se muestra en la Fig. 6.

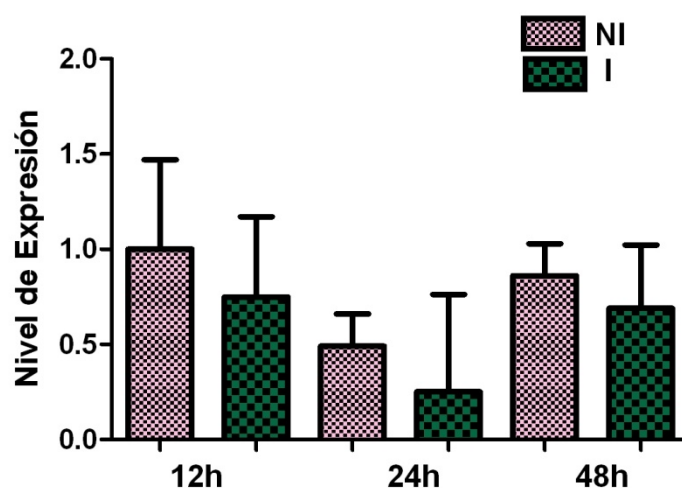
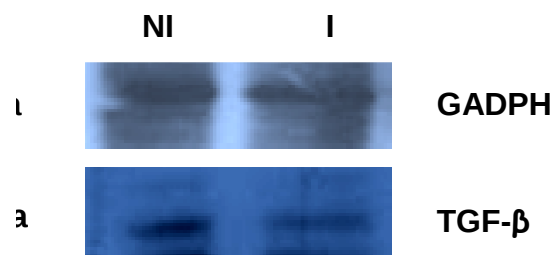


Fig.5. Determinación cuantitativa del nivel de RNAm de TGF- β en células Huh-7 infectadas con virus dengue. Las células Huh-7 se infectaron (I) o no (NI) con el virus dengue 2 a una MOI de 3 y a las 12, 24 y 48 h post-infección se extrajo el RNA total para posteriormente llevar a cabo la qRT-PCR. Como control de carga y para normalización se amplificó el RNAm de HPRT. El nivel de expresión de RNAm se determinó mediante el método de $\Delta\Delta C_t$. En el eje de las Y se encuentra graficado el nivel de expresión. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

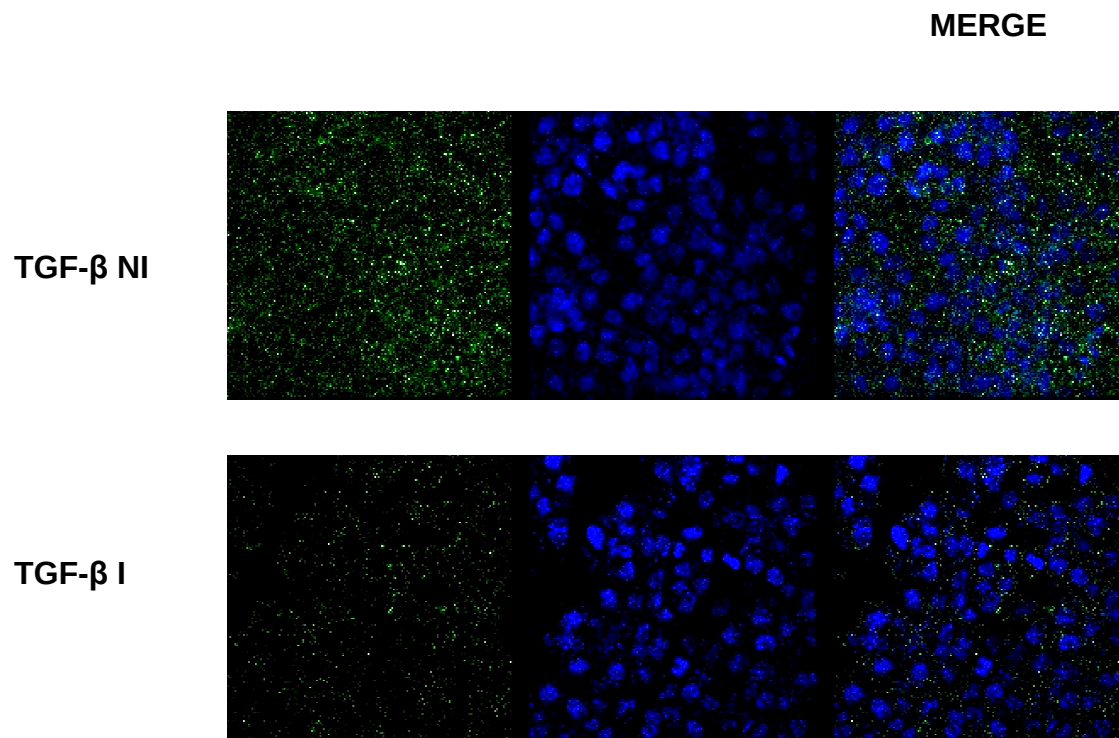


que mediante
a MOI-3. A las
de proteínas y
nas del gel se
nticuerpo anti
o a HRP para
l de carga, se
experimentos

Para confirmar lo observado en los ensayos de Western-blot, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de TGF- β mediante microscopia confocal en células Huh-7 no infectadas e infectadas por 24 h con DENV-2. Para este experimento se utilizó un anticuerpo anti-TGF- β 1 de conejo y como anticuerpo secundario un anti-conejo acoplado a Alexa 488. Lo que resultó evidente del ensayo fue que la señal de TGF- β observada en células infectadas fue considerablemente menor, en comparación con la señal detectada en las células no infectadas (Fig. 6). Lo anterior sugiere que la vía de TGF- β se ve afectada en condiciones de infección con virus dengue y respalda antecedentes que indican que los niveles de TGF- β en suero de pacientes infectados con el virus disminuyen de forma considerable (Chaturverdi U. y cols. 2000).

Por tanto, a pesar de que las diferencias en los niveles de TGF- β no fueron significativas, si se encontró una tendencia a reducir la cantidad tanto de RNAm como de proteína en las células infectadas con respecto a las no infectadas. Lo anterior implica que es posible que las moléculas que participan en la vía de señalización de TGF- β , tengan un papel en la reducción de la citocina TGF- β .

Se calculó el porcentaje relativo de fluorescencia de cada muestra y se determinó la señal emitida correspondiente a TGF- β mostró ser mayor en el caso de las células infectadas con respecto a las no infectadas (Fig. 8).



con virus dengue
) (NI) con DENV-2 a
 in un anticuerpo anti-
 xa 488, los núcleos
 con vectashield y se
 representativo de tres

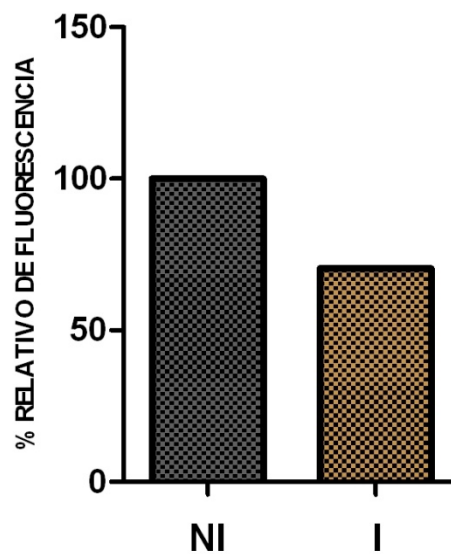


Fig. 8. Determinación cuantitativa relativa del nivel de TGF- β en células infectadas con virus dengue por inmunofluorescencia. La cuantificación relativa se determinó mediante el programa LAS AF Lite (Leica), el cual hace una medición de la fluorescencia relativa de la señal emitida, en diferentes puntos, esta es promediada y a partir de las condiciones control, se hace un estándar porcentual. En el eje de las Y se encuentra graficado el porcentaje relativo de fluorescencia calculado según la señal emitida. El resultado es la intensidad de fluorescencia de la imagen mostrada en la Fig. 7.

Expresión de LTBP3 de la vía de TGF- β , como blanco potencial del hsa-miR-149*, en células no infectadas e infectadas con dengue.

Algunos microRNAs pueden llevar a cabo funciones en la regulación de los niveles de expresión de moléculas relacionadas con la respuesta inmune antiviral. El presente trabajo pretende determinar el papel que pudiera desempeñar el hsa-miR-149* en la infección con dengue debido principalmente a que los niveles de expresión de dicho microRNA aumentan significativamente ante la infección.

El hsa-miR-149* tiene como posibles blancos a diversas moléculas que participan en la vía de TGF- β entre los que se encuentra LTBP3 la cual se asocia a TGF- β para estabilizar dicha molécula antes de unirse a su receptor y desencadenar la señalización que culmina en la expresión de diversas citocinas, como IL6, entre otras. Con la finalidad de determinar el nivel de expresión de LTBP3 en la infección con dengue a las 12, 24 y 48 h en células Huh-7 se realizó RT-PCR en punto final para detectar el nivel de su RNAm. A partir de estos experimentos se determinó que el nivel del RNAm de LTBP3 se encuentra ligeramente aumentado en células infectadas en todos los tiempos probados, en comparación con las no infectadas (Fig. 9).

Para tener datos cuantitativos de las diferencias en la expresión del RNAm de LTBP3 se llevó a cabo RT-PCR en tiempo real en una cinética de infección de 12, 24 y 48 h, los resultados coincidieron con los obtenidos por RT-PCR en punto final (Fig. 9). El ensayo cuantitativo reporta un aumento significativo en la expresión de al menos 4.5 veces en células infectadas con respecto a las células no infectadas a las 12 y 24 h post-infección (Fig. 10). Sin embargo, a las 48 h post-infección se observa que en células infectadas disminuye la expresión del RNAm de LTBP3 en comparación con las no infectadas.

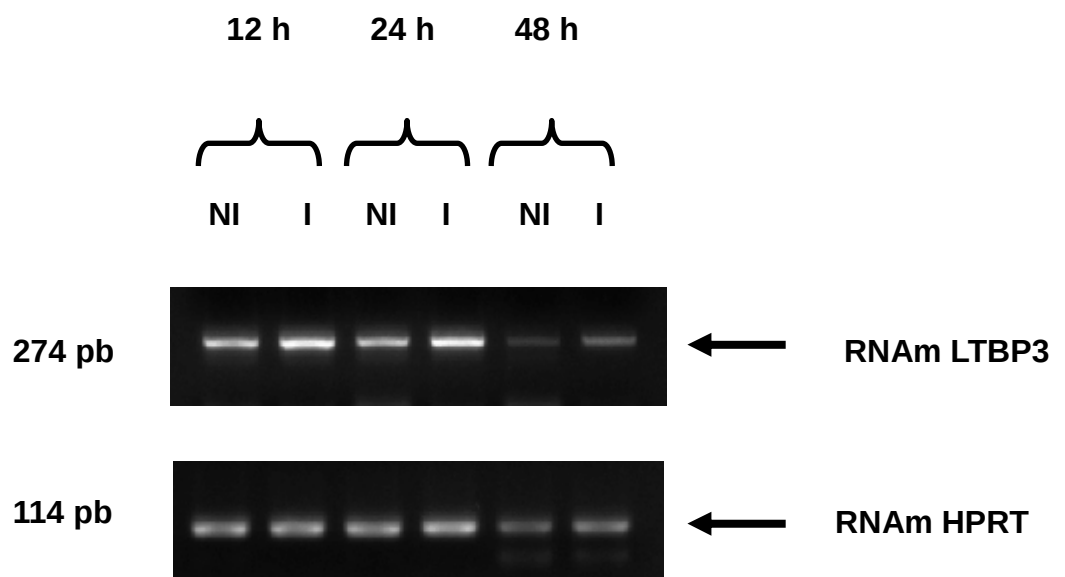


Fig. 9. Expresión del RNAm de LTBP3 en células infectadas con virus dengue mediante RT-PCR en punto final. Las células Huh-7 se infectaron (I) o no (NI) con virus DENV-2 a una MOI-3 y se cosecharon a las 12 o 24 h post-infección para realizar extractos totales de RNA a partir de los cuales se llevó a cabo la amplificación del RNAm de LTBP3 o de HPRT como control de carga. Los productos de la reacción se separaron en gel de agarosa al 1.5 % y se tiñeron con bromuro de etidio. La imagen es un resultado representativo de tres experimentos

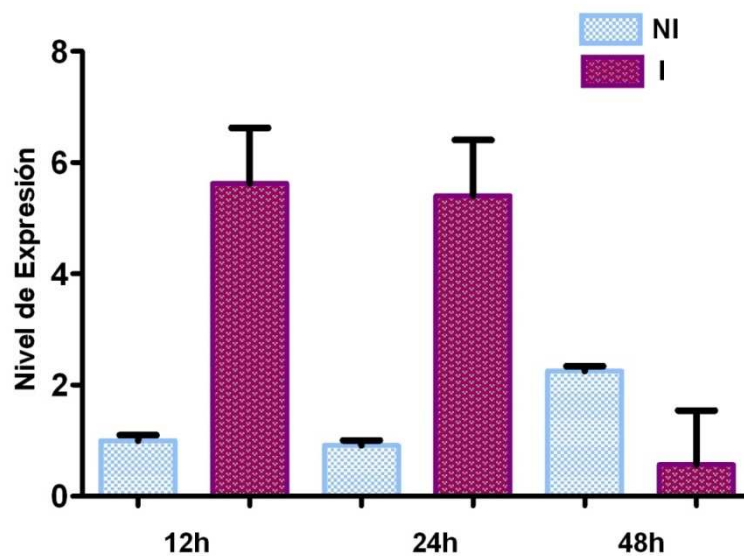


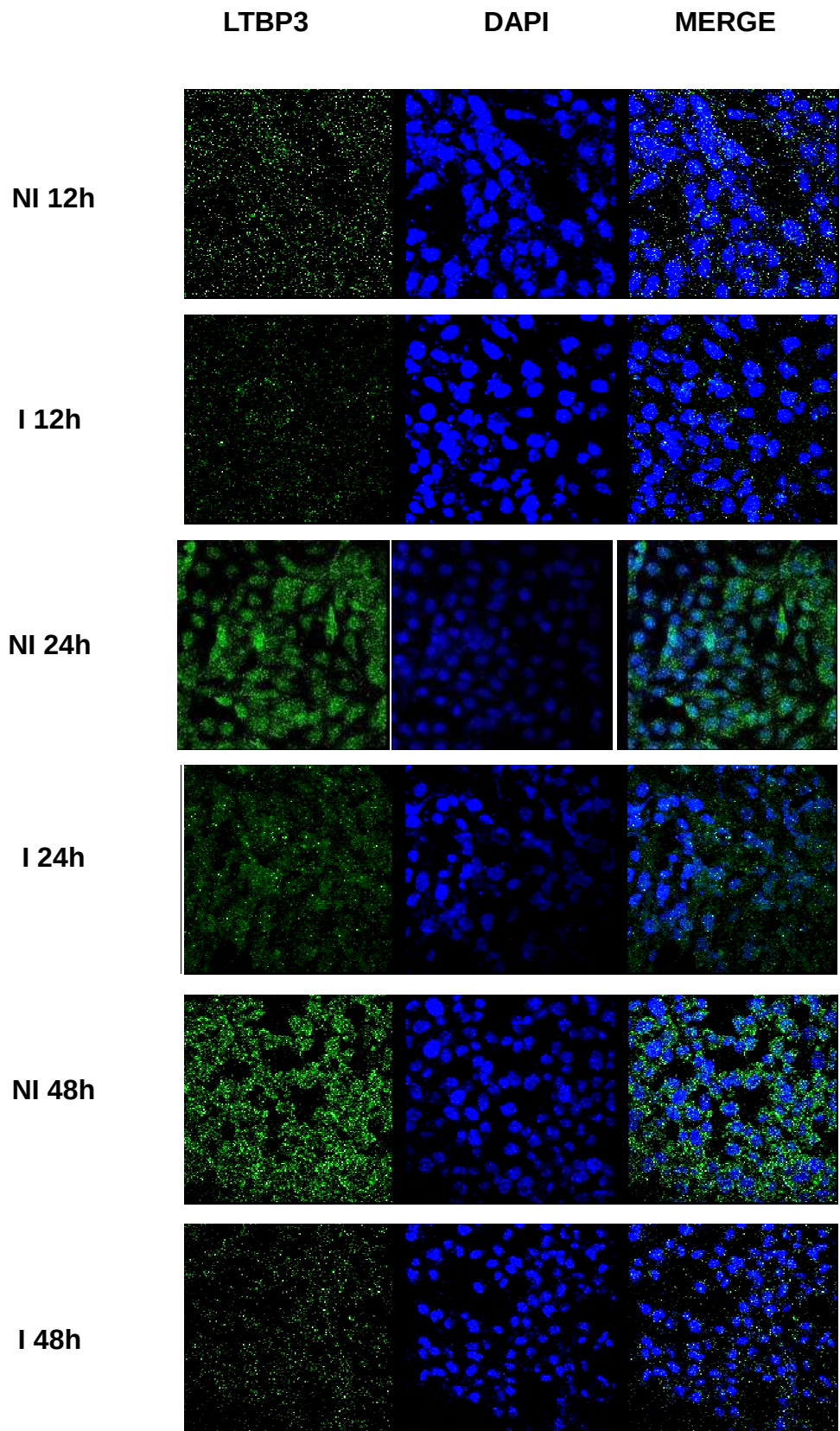
Fig. 10. Determinación cuantitativa del nivel expresión del RNAm de LTBP3 en células Huh-7 infectadas con virus dengue. Las células Huh-7 se infectaron (I) o no (NI) con DENV-2 a una MOI de 3 y a las 12, 24 y 48 h post-infección se extrajo el RNA total para posteriormente llevar a cabo la qRT-PCR. Como control de carga para normalización se amplificó el RNAm de HPRT. El nivel de expresión de dicho RNAm se determinó mediante el método de $\Delta\Delta C_t$. En el eje de las Y se encuentra graficado el nivel de expresión. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

Para determinar las diferencias en la expresión LTBP3 en células Huh-7 infectadas y no infectadas se realizaron ensayos de inmunofluorescencia a las 12, 24 y 48 h post-infección utilizando un anticuerpo anti-LTBP3, como se puede observar en la Fig. 11 las células infectadas presentan una disminución significativa de dicha proteína con respecto a las células no infectadas, en todos los tiempos.

Este hecho, se confirmó al realizar la cuantificación de la señal correspondiente a LTBP3 de los ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 12) en donde podemos observar en la gráfica la disminución de su expresión en condiciones de infección.

Los resultados obtenidos sugieren que existe una regulación de la expresión de LTBP3 en las células infectadas con dengue, además se postula que la modulación en la expresión de dicha proteína se podría dar a nivel de bloqueo traduccional y no debido a la degradación del RNAm debido a que los niveles de RNAm son más altos en células infectadas, lo que contrasta con una menor cantidad de proteína.

Por lo tanto se sugiere que el hsa-miR-149* podría actuar en el RNAm de LTBP3 como blanco de la maquinaria de inhibición de los miRNAs a nivel de bloqueo traduccional, lo cual ha sido previamente reportado para diversos miRNAs y sus blancos (Pillai R.S., y cols., 2004, Pillai R.S., 2005)



Las células con virus dengue (NI) con DENV-2 a una hora post-infección fueron teñidas con anticuerpo anti-LTBP3 y DAPI, confocal. La imagen es

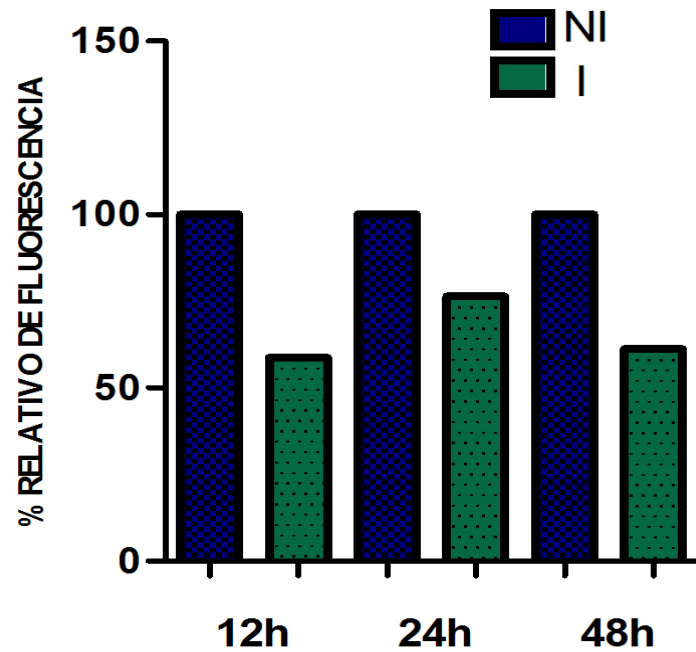


Fig. 12. Determinación cuantitativa relativa del nivel de LTBP3 en células Huh-7 infectadas con virus dengue por inmunofluorescencia. La cuantificación relativa de LTBP3 se determinó mediante el programa LAS AF Lite (Leica), el cual hace una medición de la fluorescencia relativa de la señal emitida, en diferentes puntos, la cual es promediada y a partir de las condiciones control, se hace un estándar porcentual. En el eje de las Y se encuentra graficado el porcentaje relativo de fluorescencia calculado según la señal emitida. El resultado es la intensidad de fluorescencia de la imagen mostrada en la Fig. 11.

Expresión de LTBP3, en células que sobreexpresan el hsa-miR 149*.

Con la finalidad de determinar el efecto de la sobreexpresión e inhibición del hsa-miR-149* en la expresión de la proteína LTBP3 durante infección por dengue, se realizaron ensayos de mimetismo e inhibición de dicho miRNA transfectando células Huh-7 con precursores e inhibidores del hsa-miR-149*.

Después de 24 o 48 h de transfección se determinó el nivel del hsa-miR-149* en extractos de RNAs pequeños mediante RT-PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan.

En la Fig. 13, se observa que después de 24 h de transfección del precursor del hsa-miR-149* la concentración se incrementa 17 veces comparado con el nivel de dicho miRNA cuando las células se transfectan con un precursor no relacionado. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor específico no modificó significativamente la concentración del hsa-miR-149* con respecto a las células tratadas con un inhibidor no relacionado.

Por otro lado, el tratamiento con los precursores a las 48 h post-transfección resultó en un aumento de 13 veces del miRNA específico con respecto al control y de la misma manera que a las 24 y 48 h no existen diferencia en el nivel de dicho miRNA en las células tratadas con los inhibidores específicos con respecto al inhibidor control.

Con el fin de saber si la sobreexpresión o inhibición del hsa-miR-149* se modificaba dependiendo de las concentraciones de los precursores o inhibidores, se realizó la transfección con 50 o 100 nM de dichas moléculas. Sin embargo a las 24 h post-transfección se observó una sobreexpresión similar del miRNA específico al de la transfección con 30nM, además no se observó inhibición alguna en el caso de la transfección con los inhibidores (Fig. 14), por lo tanto se decidió llevar a cabo los experimentos posteriores utilizando los precursores a una concentración de 30 nM.

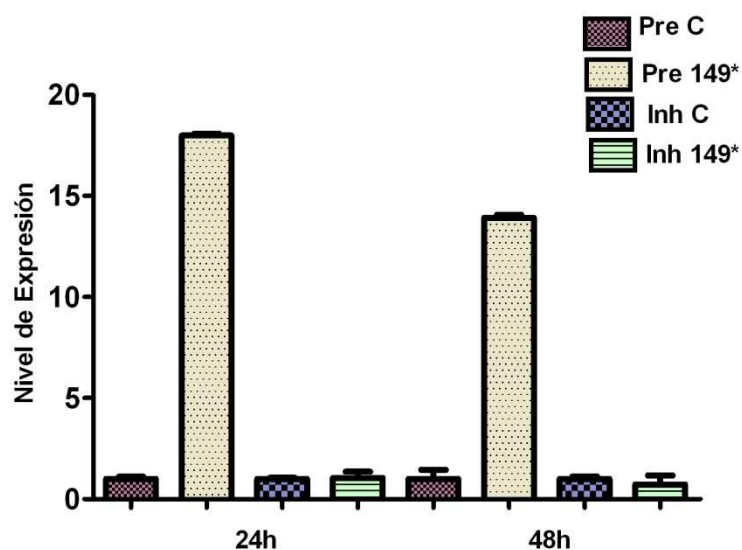


Fig. 13. Expresión del hsa-miR-149* en células Huh-7 transfectadas con 30nM del precursor e inhibidor de hsa-miR-149*. Las células Huh-7 se transfectaron con el precursor (Pre 149*) o con un precursor control (Pre C) y el inhibidor del hsa-miR-149* (Inh 149*) o el inhibidor control (Inh C) a una concentración de 30nM. Las células se cosecharon a las 24 y 48 h post-transfección, posteriormente se realizaron extractos de RNAs pequeños para determinar mediante RT-PCR en tiempo real mediante sondas Taqman la expresión del hsa-miR-149*. Como control de normalización se determinó la expresión del RNA pequeño U6. Los niveles de expresión del hsa-miR-149* se calcularon mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. En el eje de las Y se encuentra graficado el nivel de expresión. El resultado es el promedio de las intensidades de fluorescencia de las imágenes obtenidas de tres experimentos independientes.

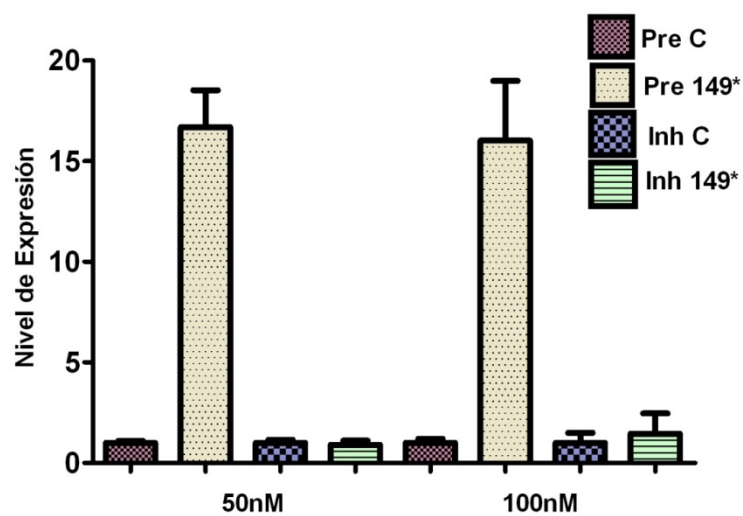


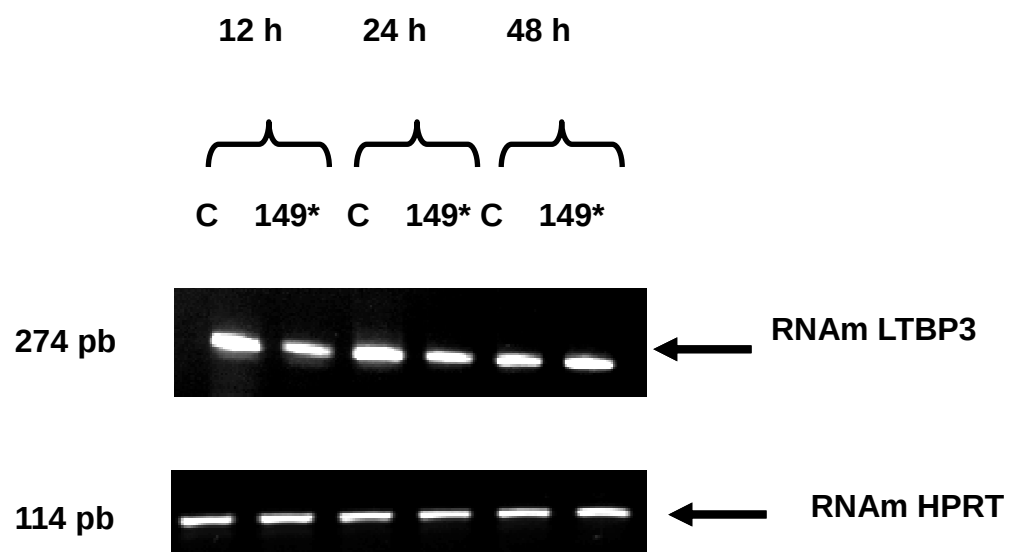
Fig. 14. Expresión del hsa-miR-149* en células Huh-7 transfectadas con 50 y 100 nM del precursor e inhibidor de dicho miRNA. Las células Huh-7 Se transfectaron con el precursor (Pre 149*) o con un precursor control (Pre C) y el inhibidor del hsa-miR-149* (Inh 149*) o el inhibidor control (Inh C) a una concentración de 50 Y 100nM y se cosecharon a las 24 h post-transfección. Posteriormente se extrajeron los RNAs pequeños para determinar mediante RT-PCR en tiempo real mediante sondas Taqman la expresión del hsa-miR-149*. Como control de normalización se determino la expresión del RNA pequeño U6. Los niveles de expresión del hsa-miR-149* se calcularon mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. En el eje de las Y se encuentra graficado el nivel de expresión. El resultado es el promedio de las intensidades de fluorescencia de las imágenes obtenidas de tres experimentos independientes.

Para determinar si la expresión del gen *ltbp3* podría modularse debido a la actividad del hsa-miR-149* sobre la 3'UTR del transcrito de dicho gen, se llevaron a cabo ensayos de mimetismo del hsa-miR-149* y posteriormente se determinó si existía modulación de LTBP3 a nivel del RNAm o de la proteína.

Los experimentos de mimetismo se llevaron a cabo transfectando 30 nM del precursor del hsa-miR-149* o y de una secuencia de un miR no relacionado en las células Huh-7 y 24 h post-transfección se determinó el nivel del RNAm de LTBP3 como se puede observar en la Fig. 15. Sin embargo, a las 12 h se detectó una clara disminución del RNAm de LTBP3, la expresión de dicho RNAm a las 24 y 48 h no presenta diferencias significativas

Para llevar a cabo la cuantificación del RNAm de LTBP3 se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real, donde se pudo observar que a las 24 y 48 h no existe diferencia significativa, en la expresión de dicho RNAm entre las células transfectadas con el precursor control y el precursor del hsa-miR-149* (Fig. 16). Sin embargo es posible observar diferencias en la expresión del RNAm de LTBP3 a las 12 h. Por lo anterior se concluye que la sobreexpresión del hsa-miR-149* a las 12 h correlaciona con la degradación del RNAm de LTBP3.

Para determinar el efecto del mimetismo del hsa-miR-149* en la expresión de la proteína LTBP3, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células Huh-7 no tratadas, transfectadas con el precursor del miRNA 149* y con el precursor control a una concentración de 30 nM a las 12, 24 y 48 h post-transfección. En la Fig. 17 se puede observar que la proteína LTBP3 se encuentra disminuida en el caso de las células tratadas con el precursor del hsa-miR-149* en todos los tiempos evaluados en comparación con la cantidad de dicha proteína que se detecta en las células tratadas con el precursor no relacionado.



n del hsa-miR-149*
un precursor control
4 h post-transfección
o la amplificación del
acción se separaron
gen es un resultado

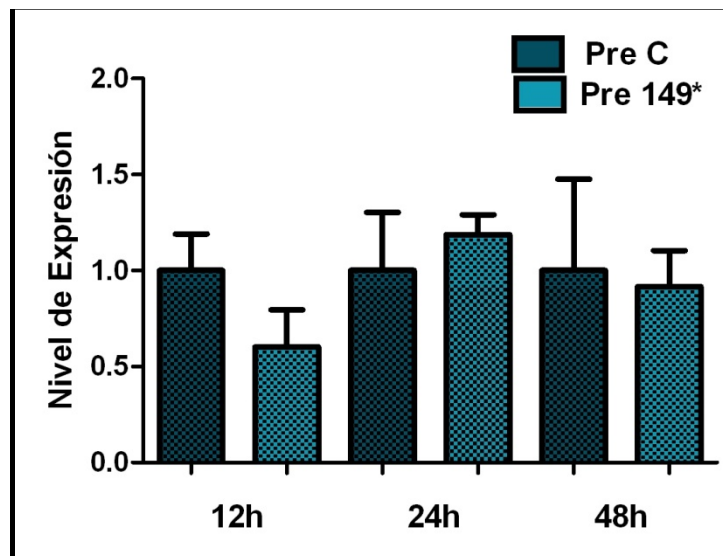


Fig. 16. Determinación cuantitativa del nivel de expresión del RNAm de LTBP3 en células transfectadas con el hsa-miR-149*. Las células Huh-7 Se transfectaron con el precursor (Pre 149*) o con un precursor control (Pre C) a una concentración de 30nM y se cosecharon a las 12,24 y 48 h post-transfección. Se realizaron extractos de RNA total para posteriormente llevar a cabo RT-PCR en tiempo real utilizando los iniciadores de LTBP3 y como control de carga para normalización se amplificó el RNAm de HPRT. Los niveles de expresión de los RNAm se calcularon mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. En el eje de las Y se encuentra graficado el nivel de expresión. El resultado es el promedio de tres experimentos independientes

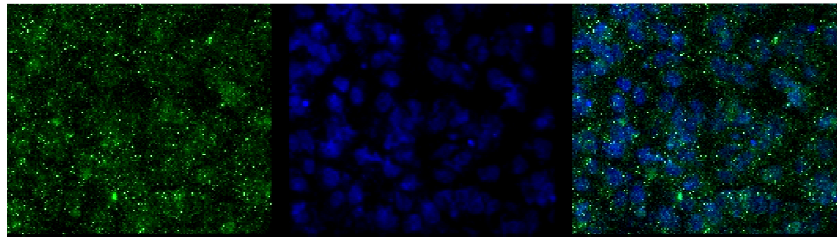
Para confirmar lo observado en la inmunofluorescencia se llevó a cabo la determinación cuantitativa de la señal emitida y se graficó en la Fig. 18, con lo cual se corrobora que en todos los tiempos el nivel de LTBP3 es menor en las células tratadas con el mimetizador específico.

Por todo lo anterior, es posible establecer que bajo las condiciones en las que se llevaron a cabo nuestros experimentos las células que sobreexpresan el hsa-miR-149* presentan inhibición de la expresión de la proteína LTBP3 en los tres tiempos probados, sin embargo sólo a las 12 h post-tratamiento el RNAm de dicha proteína se encontraba disminuido con respecto al el tratamiento con el precursor control. Por lo tanto, nuevamente se sugiere que la modulación del hsa-miR-149* sobre LTBP3 se podría llevar a cabo a nivel de bloqueo traduccional.

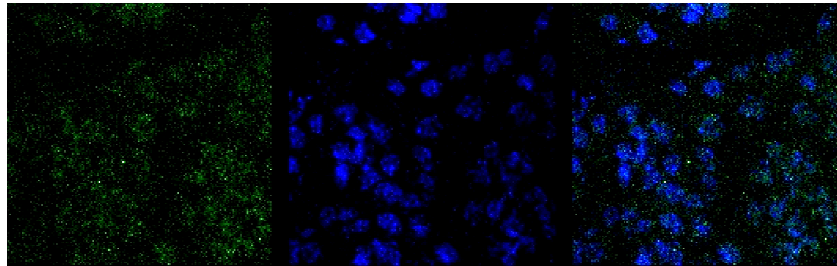
Posteriormente se realizó el análisis de LTBP3 en células transfectadas por 24 h con el precursor control o el precursor del hsa-miR-149*, y además infectadas con dengue mediante microscopía confocal. Lo que resultó evidente fue que el nivel de expresión de LTBP3 disminuyen en las células tratadas con el mimetizador del hsa-miR-149* tanto en células no infectadas como en células infectadas (Fig. 19). Esto se corrobora al realizar la cuantificación de señal de fluorescencia (Fig. 20.).

MERGE

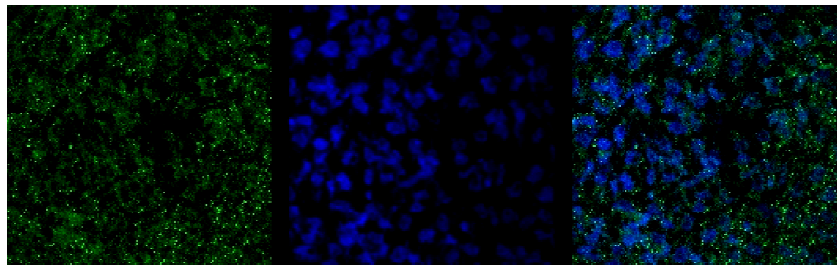
Pre C
12h



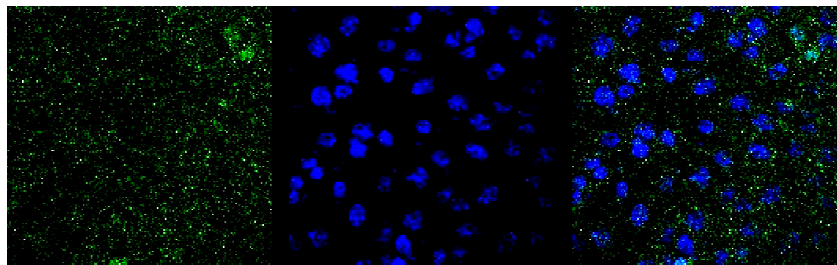
Pre 149*
12h



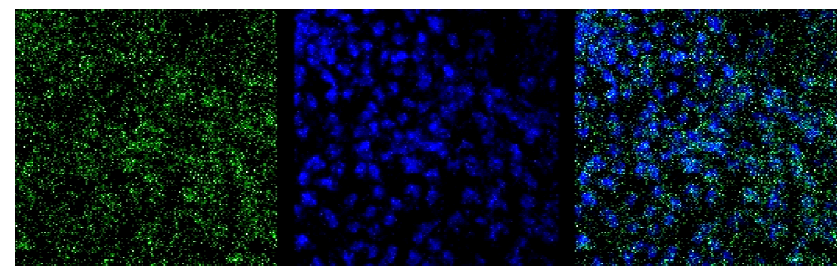
Pre C
24h



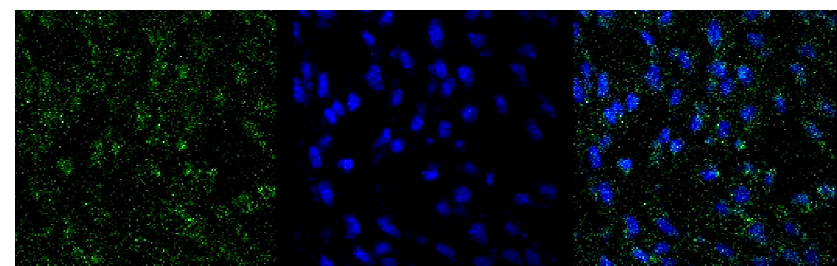
Pre 149*
24h



Pre C
48h



Pre 149*
48h



hsa-miR-149*en
miRNA 149* (Pre
ron a las 12, 24 y
.TBP3 y después
celulares fueron
se observaron al
es experimentos

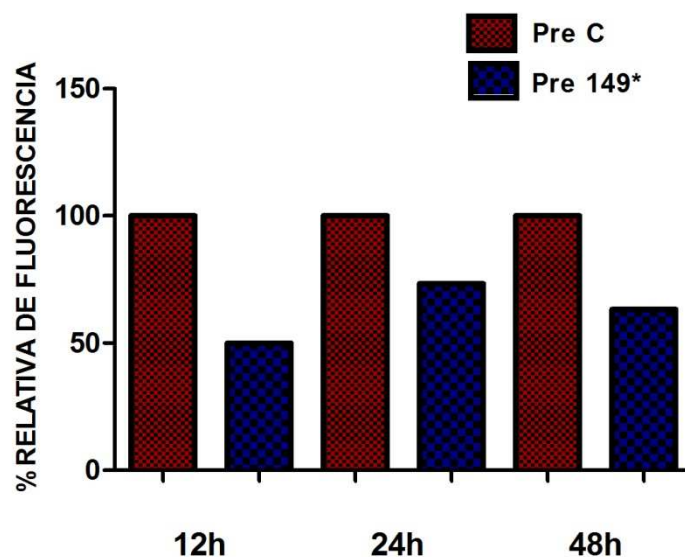
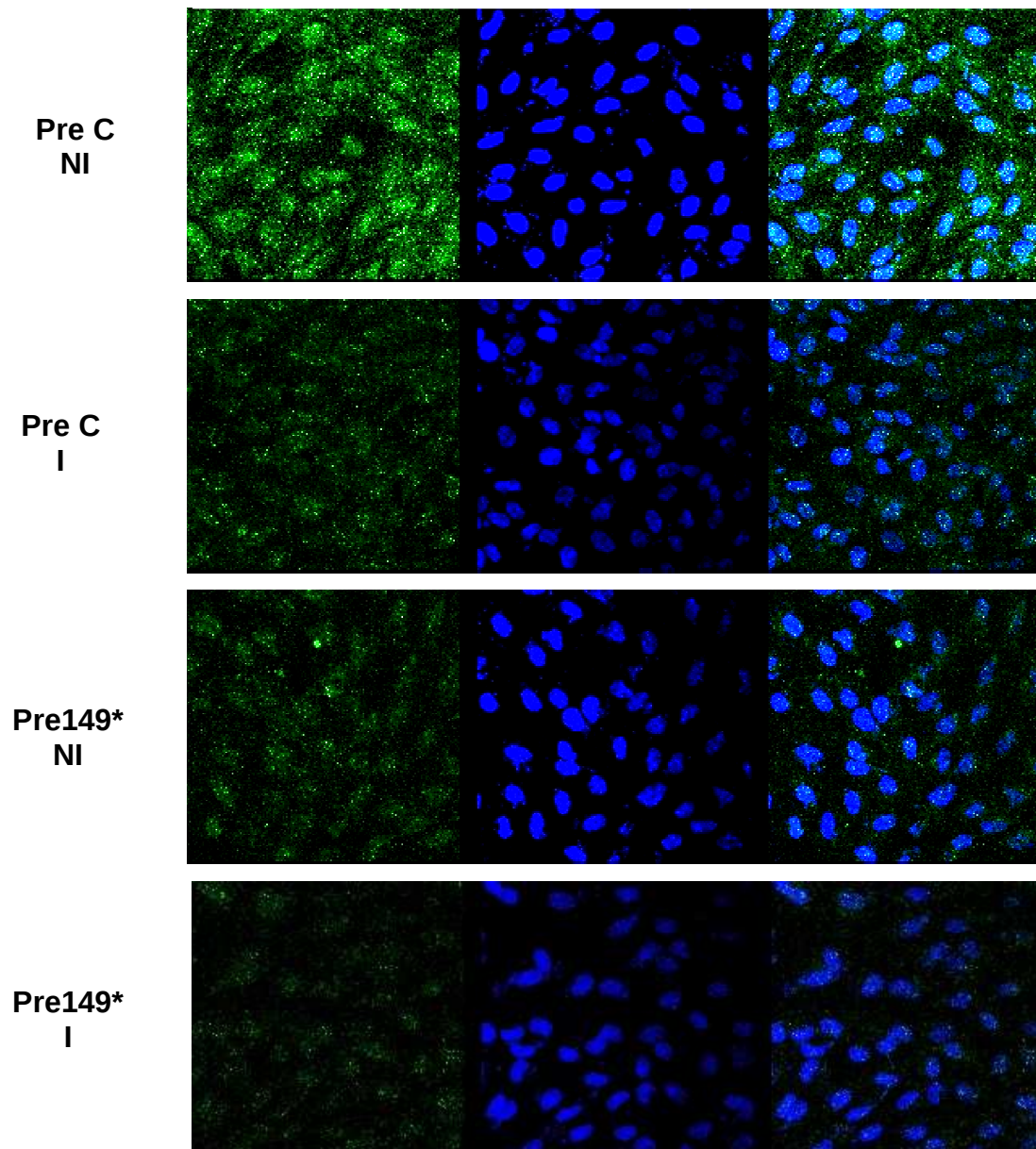


Fig. 18. Determinación cuantitativa relativa del nivel de LTBP3 en células mimetizadas con el hsa-miR-149* por inmunofluorescencia. La cuantificación relativa se determinó mediante el programa LAS AF Lite (Leica), el cual hace una medición de la fluorescencia relativa de la señal emitida, en diferentes puntos, la cual es promediada y a partir de las condiciones control, se hace un estándar porcentual. En el eje de las Y se encuentra graficado el porcentaje relativo de fluorescencia calculado según la señal emitida. El resultado es la intensidad de fluorescencia de la imagen mostrada en la Fig. 17.

MERGE



El hsa-miR-149* e
precursor del miRNA
0 nM, después de
fijaron las células
BP3 y después se
res fueron teñidos
ron al microscopio
pendientes.

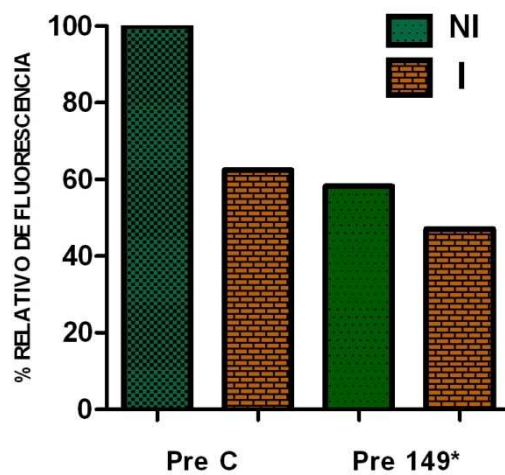
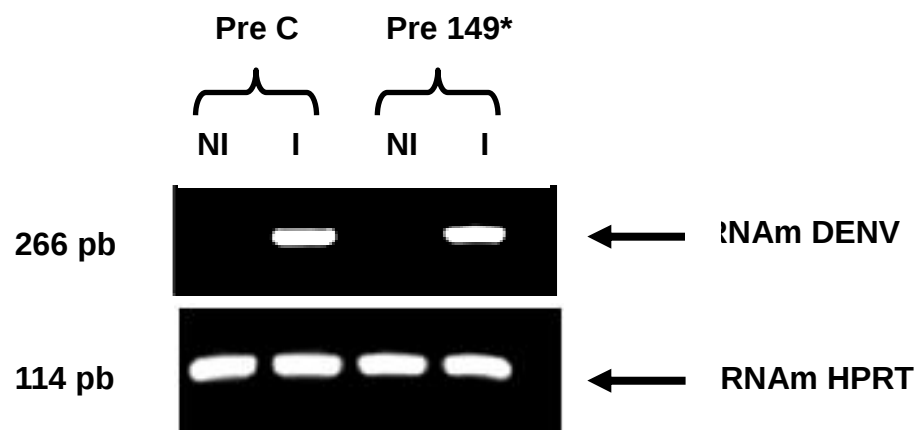


Fig. 20. Determinación cuantitativa relativa del nivel de LTBP3 en células mimetizadas con hsa-miR-149* e infectadas por virus dengue mediante inmunofluorescencia. La cuantificación relativa se determinó mediante el programa LAS AF Lite (Leica), el cual hace una medición de la fluorescencia relativa de la señal emitida, en diferentes puntos, la cual es promediada y a partir de las condiciones control, se hace un estándar porcentual. En el eje de las Y se encuentra graficado el porcentaje relativo de fluorescencia calculado según la señal emitida. El resultado es la intensidad de fluorescencia de la imagen mostrada en la Fig. 19.

Efecto del hsa-miR-149* en la eficiencia de infección con dengue.

De acuerdo con lo observado en los resultados de los experimentos anteriores se encontró una correlación entre la sobreexpresión del hsa-miR-149* y la disminución en la detección tanto de LTBP3 como de TGF- β . Por lo tanto se llevaron a cabo experimentos para determinar si la sobreexpresión de dicho miRNA tiene algún efecto en la eficiencia de multiplicación viral, para lo cual se transfectaron las células Huh-7 con el precursor no relacionado y con precursor del hsa-miR-149* y a las 24 h post-transfección se llevó a cabo la infección con DENV-2 a una MOI de 3 y después de 24 h se extrajo el RNA total para determinar mediante RT-PCR en tiempo real los niveles de RNA viral presentes después de cada uno de los tratamientos. Los iniciadores utilizados para la detección del RNA viral corresponden a un fragmento de 266 pb de la proteína no estructural NS5. En la Fig. 21 se pueden observar los resultados de la RT-PCR en punto final en la que se detecta la banda del tamaño esperado, en las células infectadas y mimetizadas con el hsa-miR-149*, la banda se presenta más tenue.

Por otro lado, se puede observar en los resultados de la RT-PCR (Fig22) se observa que las células tratadas con el hsa-miR-149* tuvieron una disminución del RNA viral del 40% aproximadamente con respecto a las células tratadas con el precursor control. Lo anterior nos podría estar señalando que la respuesta celular a la sobreexpresión del hsa-miR-149* correlaciona con una disminución de la infección causada por dengue.



usan el hsa-miR-149*. Las
(.49*) o del precursor control
las 24 h post-infección se
proteína viral NS5 se realizo
:

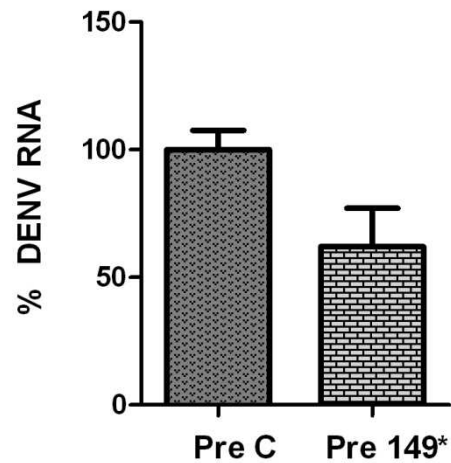


Fig. 22. Eficiencia replicativa cuantitativa del virus dengue en células que sobreexpresan el hsa-miR-149*. Las células Huh-7 se transfectaron con 30nM del precursor del hsa-miR-149* (Pre 149*) o del precursor control (Pre C), 24 h post-transfección, se infectó con DENV-2 a una MOI de 3 y a las 24 h post-infección se extrajo el RNA total y utilizando iniciadores correspondientes a la región de la proteína viral NS5 se realizó RT-PCR en tiempo real y como control de carga se amplificó el RNAm de HPRT. En el eje Y se encuentra el nivel de expresión. Los niveles de expresión de los RNAm se determinaron mediante el método de $\Delta\Delta C_t$. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

El presente trabajo se enfocó en determinar el efecto del hsa-miR-149* en la modulación de la vía de TGF- β en las células Huh-7 infectadas con el virus dengue. Nuestros resultados mostraron que en la infección con dengue las células producen menos TGF- β que las células no infectadas y que tanto en las condiciones de infección como en la sobreexpresión del hsa-miR-149* se disminuye la proteína LTBP3, la cual es un cofactor para promover la actividad de dicha citocina.

Primeramente, mediante western blot se determinó que en las células Huh-7 se disminuye la expresión de TGF- β después de la infección con dengue. En nuestro estudio también se determinó que el RNAm de TGF- β mostró una tendencia a disminuir en el caso de las células infectadas a las 12, 24 y 48 h post-infección. Lo anterior se relaciona con los hallazgos encontrados por Chaturvedi y cols., quienes realizaron un estudio de las citocinas expresadas en sueros de pacientes con fiebre por dengue, encontrando que TGF- β se encontraba disminuida, pero en los casos de los pacientes con fiebre hemorrágica por dengue esta citocina se veía aumentada. Por otro lado, en el 2006, Azeredo y cols. estudiando sueros de pacientes con dengue determinaron que TGF- β se encontraba aumentado en los casos severos de dengue así como en los estados tardíos de la infección por lo que se propone que su expresión podría implicar un estado inhibitorio de la proliferación de los linfocitos T y sus efectos, lo cual produciría un estado antiinflamatorio.

Existen diversos mecanismos que la célula utiliza para regular la expresión genética siendo una de las recientemente demostradas, la vía de los miRNAs, la cual se lleva a cabo a nivel postraducciona l y en el caso de situaciones de estrés como la infección por el virus dengue se podría presentar la regulación de moléculas de la respuesta inmune como las citocinas y específicamente la citocina antiproliferativa TGF- β . Para determinar si los miRNAs que se modifican ante la infección con dengue podrían inducir tal modulación se realizaron análisis *in silico* para determinar los RNAm blancos que potencialmente se afectan por Let-7c y el hsa-miR-149*, principalmente

sobreexpresados en células Huh-7 ante la infección por dengue. A partir de ello, se enfocó nuestra atención en la proteína LTBP3, la cual presenta dos sitios putativos de interacción con el hsa-miR-149* en la 3'UTR de su RNAm. Además de LTBP3, existen otras proteínas que podrían ser blancos de dichos miRNAs y que participan en la vía de señalización y activación de TGF- β , sin embargo, LTBP3 presenta diversas características que la hacen un buen blanco de estudio para conocer si existe modulación de la respuesta inmune, específicamente en la vía de TGF- β mediada por miRNAs tras la infección con dengue.

LTBP3 es una proteína que forma parte del complejo largo de TGF- β , el cual es indispensable para la maduración y secreción de la citocina, de tal manera que existen estudios que muestran que ratones knock-out para LTBP3 presentan las mismas características que los ratones knock-out de TGF- β , donde su desarrollo y sobrevivencia se ven truncados por falta de estos genes. También se demostró que debido a la falta de LTBP3 se presenta la disminución de TGF- β (Dabovic, 2002). De esta forma se planteó que al verse afectada la expresión de LTBP3 por el hsa-miR-149* la concentración de TGF- β también disminuiría.

En condiciones de infección de las células Huh-7 se observó que el RNAm de LTBP3 se encuentra sobreexpresado, sin embargo, los niveles de proteína estaban disminuidos. Por tanto es posible postular que existen mecanismos postraduccionales que promueven dicho comportamiento, uno de éstos podría ser el bloqueo traduccional que se ha descrito que lleva a cabo la maquinaria de los miRNAs. Este caso de regulación, puede darse sin disminuir los niveles del RNAm como se ha demostrado para otros miRNAs y su función (Kim H.H., 2009).

Existen pocos reportes acerca de las funciones de los miRNAs*, la mayoría de los estudios realizados con éstos se relacionan con vías celulares primordiales para el mantenimiento, desarrollo y defensa de la célula hacia algún padecimiento como es el caso del miR-9*, el cual inhibe la expresión de la proteína denominada CoREST. Esta proteína es un represor de la proteína REST, la cual está involucrada en la modulación de la actividad neuronal y en

pacientes con enfermedad de Huntington el miR-9* inhibe la expresión de la proteína CoREST y la actividad neuronal se ve afectada (Packer A.N., 2008). Por otro lado, el miR-99a* tiene blancos involucrados en la vía de TGF- β como son SMAD1 y ERK2, de tal manera que al sobreexpresar el miR-99a* se induce la apoptosis en células con cáncer (Kim S., 2008, Lin E.A., 2009). Por lo anterior, se postula que la regulación de proteínas mediada por miRNAs* tiene participación en la defensa celular ante enfermedades humanas.

En el caso del hsa-miR-149*, se ha reportado que tiene dos RNAm blancos probados AKT1 y E2F1 y la inhibición de su expresión correlaciona con el aumento de apoptosis (Lin. R-Y y cols., 2010), de tal manera que en la infección por dengue la expresión de dicho miRNA podría influir en la eficiencia con la que el virus infecta debido a que este patógeno también presenta la capacidad de inducir apoptosis.

Con la finalidad de determinar el efecto de la sobreexpresión e inhibición del miRNA-149* en la expresión de la proteína LTBP3 en células infectadas por el virus dengue se realizaron ensayos de mimetismo e inhibición de dicho miRNA transfectando células Huh-7 con precursores e inhibidores del miRNA-149*. El aumento de más de 17 veces en la expresión del miRNA en condiciones de mimetismo fue claramente demostrado mediante RT-PCR en tiempo real, sin embargo, la disminución de la expresión de dicho miRNA mediante la transfección de inhibidores específicos no se logró aún al transfectar hasta 100 nM de los inhibidores. Lo anterior correlaciona con lo reportado en el artículo de Lin R. y cols. en el 2010, en donde a pesar del exceso del inhibidor del hsa-miR-149* transfectado, el hsa-miR-149* aún es capaz de ejercer regulación en sus genes blanco.

El efecto del mimetismo del hsa-miR-149* en la inhibición de la expresión del RNAm de LTBP3 sólo se observó a las 12 h post-transfección, sin embargo, a nivel de proteína el efecto inhibitorio pudo observarse después de 12, 24 y 48 h de transfección, lo cual implica que la regulación en la expresión de LTBP3 que correlaciona con la sobreexpresión del hsa-miR-149* se lleva a cabo probablemente a nivel de bloqueo traduccional.

En el caso de los miRNAs de la familia de Let-7 se ha demostrado que son capaces de inhibir la expresión de proteínas conocidas como proto-oncogenes entre ellas Ras y así su modulación es crítica en la progresión del ciclo celular y en procesos como el cáncer blanco ([Johnson CD](#) y cols., 2007). En el caso de Let-7c se ha determinado que la inhibición de la expresión del receptor tipo I de TGF- β inhibe a su vez, la inducción de la vía de TGF- β ([Tzur G.](#) y cols., 2009).

Una parte muy importante del presente trabajo se enfocó en el efecto que podría inducir la sobreexpresión del hsa-miR-149* en la eficiencia de infección. Primeramente se pudo observar que en los ensayos en donde se mimetizó el hsa-miR-149* y se infectó con el virus dengue, el nivel de expresión de la proteína LTBP3 se encontraba disminuido, lo cual concuerda con lo esperado por los resultados de los experimentos previos. Además se pudo demostrar que en el caso del mimetismo del hsa-miR-149* se produce la disminución en la eficiencia de replicación viral, lo cual queda de manifiesto al detectar menor cantidad de RNA del virus del dengue en la células mimetizadas con el precursor miRNA específico que con el precursor de un miR no relacionado. Por lo anterior es de suma importancia investigar si la proteína LTBP3 es un blanco directo de dicho miRNA en las células hepáticas humanas Huh-7, lo cual estaría implicando a este factor del hospedero como una molécula ligada a aumentar la capacidad de infección del virus dengue.

Las infecciones virales tienen la capacidad de inducir una respuesta intracelular como la que se propone en esta tesis para el virus dengue con el hsa-miR-149* y la proteína de la vía de TGF- β , LTBP3. Un ejemplo ya reportado es el caso de la infección por el virus de la hepatitis B en la cual se induce la expresión del miR-200b el cual promueve la inhibición de la proteína Zfhx1b, que es un factor de transcripción involucrado estrechamente en la vía de señalización de TGF- β (Liu Y. y cols., 2009)

En otro estudio se ha demostrado que en la infección por el virus de la hepatitis C existen 50 miRNAs que se ven modulados en condiciones de infección y se determinó que uno de éstos, el miR-193b, tiene la capacidad de inhibir la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl1 y así aumentar el nivel de

las caspasas 3/7, lo cual correlacionó con una mayor capacidad de las células que presentan hepatocarcinoma celular (producido por la infección con dicho virus) de responder al tratamiento antiviral. Por tanto, es evidente que el conocimiento de los mecanismos básicos de modulación de la expresión genética tras la infección viral son de suma importancia en la formulación de terapias antivirales (Branconi C. y cols., 2010).

Los resultados encontrados en el presente trabajo permiten sugerir que el hsa-miR-149* puede funcionar como un agente de respuesta antiviral en la infección por el virus del dengue en células Huh-7.

BIBLIOGRAFIA

- [Agarwal R](#), [Elbishbishi E. A](#), [Chaturvedi U.C](#), [Nagar R](#), [Mustafa A.S](#). (1999) Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with Dengue haemorrhagic fever. International Journal of Experimental Pathology; [vol.80 \(3\)](#): 143–149.
- Ahluwalia J. K., Khan S. Z., Soni K., Rawat P., Gupta A., Hariharan M., Scaria V., Lalwani M., Pillai B., Mitra D., Brahmachari S. K. (2008). Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. Retrovirology; vol. 5:117-130
- Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B. (2003). Making sense of latent TGF- β activation. Journal of Cell Science. Vol. 116, 217-224
- Assenberg R, Mastrangelo E., Walter T. S, Verma A., Milani M., Owens R. J, Stuart D. I, Grimes J. M, Mancini E. J. (2009) Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. Journal of Virology. vol. 83(24): 12895–12906
- Azeredo E., Zagne s., Alvarenga A., Nogueira R., Kubelka C., Oliveira-Pinto L. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with Dengue fever disease. 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101(4): 437-449.
- Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, Suzuki T, Croce CM, Patel T., (2010) Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. Clinical Cancer Research. Vol. 16(3):957-66.
- Carthew R. W, Sontheimer E. J.(2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. Vol. 136(4): 642–655.
- Chable-Bessia C., Meziane O., Latreille D., Triboulet R., Zamborlini A., Wagschal A., Jacquet J.M., Reynes J., Levy Y., Saib

- A., Bennasser A., Benkirane M.(2009).Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors. *Retrovirology*. Vol.6:26-42
- Chaturvedi U., Agarwal R., Elbishbishi E., Mustafa A. (2000). Cytokine cascade in Dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Vol. 28:183-188.
 - Dabovic B., Chen Y., Colarossi C., Zambuto L., Obata H., Rifkin D. (2002). Bone defects in latent TGF- β binding protein (Ltbp)-3 null mice;a role for Ltbp in TGF- β presentation. *Journal of Endocrinology*.vol. vol.175:129–141
 - Davis B. N., Hata A. (2009). Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling*, vol. 7 (18):1-22.
 - [Djamiatun K](#), [Faradz SM](#), [Setiati TE](#), [Netea MG](#), [van der Ven AJ](#), [Dolmans WM](#). (2011).Increase of plasminogen activator inhibitor1 and decrease of transforming growthfactorb1 in children with Dengue haemorrhagic Fever in indonesia. [J Trop Pediatr](#). Vol. 57(6):424-32.
 - [Dogar A.M](#), [Towbin H](#), [Hall J](#). (2011). Suppression of latent transforming growth factor (TGF)-beta1 restores growth inhibitory TGF-beta signaling through microRNAs. [J Biol Chem](#). Vol. 286(18):16447-58.
 - Falcón-Lezama J, Sánchez-Burgos G.G., Ramos-Castañeda J. (2009). Genética de las poblaciones virales y transmisión del Dengue. *Salud Pública Mex*. Vol. 51 supl 3:S403-S409.
 - Filomatori C. V., Gamarnik . A.V. (2009). Structural and Functional Studies of the Promoter Element for Dengue Virus RNA Lodeiro Replication. *Journal of Virology*. Vol. 6:993–1008
 - Ghosh Z., Mallick B., Chakrabarti J. (2009). Cellular versus viral microRNAs in host–virus interaction. *Nucleic Acids Research*; 37(4): 1035–1048

- Gu S., Kay M. A. (2010) How do miRNAs mediate translational repression? Silence. Vol.1:1-5
- Henschel, E., Putnak J.R. (1990). The Dengue Viruses. Clinical microbiology reviews. Vol.3:376-396.
- Huang W, Li MD. (2009). Nicotine modulates expression of miR-140*, which targets the 3'-untranslated region of dynamin 1 gene (Dnm1). International Journal of Neuropsychopharmacology. Vol.12: 537–546.
- Jin L, Hu WL, Jiang CC, Wang JX, Han CC, Chu P, Zhang LJ, Thorne RF, Wilmott J, Scolyer RA, Hersey P, Zhang XD, Wu M. (2011). MicroRNA-149*, a p53responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 108(38):15840-5.
- Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. Cancer Research. Vol. 67(16):7713-22.
- Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M. 2009. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. Genes & Development. Vol. 23:1743–48.
- Kim S, Lee UJ, Kim MN, [Lee EJ](#), [Kim JY](#), [Lee MY](#), [Choung S](#), [Kim YJ](#), [Choi YC](#). (2008). MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). [The Journal of Biological Chemistry](#) Vol. 283:18158–18166.
- Klu R, Hesketh R. (2000). The latent transforming growth factor binding protein (LTBP) family. Biochemistry. Journal. Vol.352, 601±610
- Knipe D. M., Howley P. M. (2010). Fields Virology. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Vol.1: 917-1161.
- Landgraf P, [Rusu M](#), [Sheridan R](#), [Sewer A](#), [Iovino N](#), [Aravin A](#), [Pfeffer S](#), [Rice A](#), [Kamphorst AO](#), [Landthaler M](#), [Lin C](#), [Socci ND](#), [Hermida](#)

[L](#), [Fulci V](#), [Chiaretti S](#), [Foà R](#), [Schliwka J](#), [Fuchs U](#), [Novosel A](#), [Müller RU](#), [Schermer B](#), [Bissels U](#), [Inman J](#), [Phan Q](#), [Chien M](#), [Weir DB](#), [Choksi R](#), [De Vita G](#), [Frezza D](#), [Trompeter H](#), [Hornung V](#), [Teng G](#), [Hartmann G](#), [Palkovits M](#), [Di Lauro R](#), [Wernet P](#), [Macino G](#), [Rogler CE](#), [Nagle JW](#), [Ju J](#), [Papavasiliou FN](#), [Benzing T](#), [Lichter P](#), [Tam W](#), [Brownstein MJ](#), [Bosio A](#), [Borkhardt A](#), [Russo JJ](#), [Sander C](#), [Zavolan M](#), [Tuschl T](#). (2007) A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*. Vol.129: 1401–1414.

- Lin E.A, Kong L, Bai X.H, Luan Y, Liu C.J. (2009) miR-199a*, a bone morphogenic protein 2 responsive microRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. [The Journal of Biological Chemistry](#). Vol..284:11326–11335.
- Lin R-J., Lin Y-C., Yu L. A. (2010) hsa-miR-149* Induces Apoptosis by Inhibiting Akt1 and E2F1 in Human Cancer Cells. *Molecular Carcinogenesis*. Vol. 49:719
- [Liu Y](#), [Zhao JJ](#), [Wang CM](#), [Li MY](#), [Han P](#), [Wang L](#), [Cheng YQ](#), [Zoulim F](#), [Ma X](#), [Xu DP](#). (2009) Altered expression profiles of microRNAs in a stable hepatitis B virus-expressing cell line. *The journal of Chinese Medicine*. Vol. 122(1):10-14
- Marek A, Brodzicki J., Liberek A., Korzon M. (2002) TGF- β (transforming growth factor- β) in chronic inflammatory conditions – a new diagnostic and prognostic marker? *Medical Science Monitor*. Vol. 8(7): RA145-151
- Musiyenko A, Bitko V, Barik S. (2008) Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells. *Journal of Molecular Medicine*. Vol. 86:313–322.
- Narry Kim, V. (2005) Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function. *Molecular Cell*. Vol. 19:1-15

- Nathans R., Chu C., Serquina A. K., Lu C., Cao H., Rana T. M. (2009). Cellular microRNA and P-bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Molecular Cell*. Vol. 34(6): 696–709.
- Niepmann M.(2009). Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle*. Vol. 8:10, 1473-1477.
- Noren Hooten N., Abdelmohsen K., Gorospe M., Ejiogu N., Zonderman A.B., Evans M. K. (2010). microRNA Expression Patterns Reveal Differential Expression of Target Genes with Age. *PLoS ONE*, Vol. 5: 1-13.
- Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL. 2008 The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience*.. Vol. 28:14341–14346
- Penttinen C, Saharinen J, Weikkolainen K, Hyytiäinen M, Keski-Oja J. (2002). Secretion of human latent TGF- β binding protein-3 (LTBP-3) is dependent on co-expression of TGF- β . *Journal of Cell Science*. Vol. 115, 3457-3468
- Perron M. P., Provost P. (2010) Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Frontiers in Biosciences*. Vol.13: 2537–2547
- Pillai R. S. (2005). MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA. *RNA*. Vol.11:1753–1761
- Ruey-Jen L., You-Chin L., Yu, A. L. (2010). hsa-miR-149* Induces Apoptosis by Inhibiting Akt1 and E2F1 in Human Cancer Cells. *Molecular carcinogenesis*. Vol. 49:719–727.
- Scaria V., Hariharan M., Maiti S., Pillai B., Brahmachari S. K. (2006). Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*. Vol. 3:68
- Schmidt A. G., Yang P.L., Harrison S.C.(2010) Peptide Inhibitors of Dengue-Virus Entry Target a Late-Stage Fusion Intermediate.. *PLoS Pathogens*. Vol. 6: 1-11

- Secretaria de Salud. (2011). Panorama epidemiológico de fiebre y fiebre hemorrágica por Dengue en entidades federativas. Sem. Epid. N°22.
- Shomron S., Levy C. (2009) MicroRNA-Biogenesis and Pre-mRNA Splicing Crosstalk. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol.1:1-6
- Stephenson, J. (2005). Understanding Dengue pathogenesis: implications for vaccine design. Bulletin of the World Health Organization. Vol. 83 (4):308-314.
- Unsöld C., Hyytiäinen M, Bruckner-Tuderman L, Keski-Oja J. (2000). Latent TGF- β binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. Journal of Cell Science. Vol.114, 187-197
- Vázquez-Ortiz G., Piña-Sánchez P., Salcedo M. (2006). Grandes alcances de los RNAs pequeños, RNA de interferencia y microRNA. Revista de. Investigación Clínica. Vol. 58 (4): 335-349.
- Wu Z., Zhu Y., Bisaro D. M., Parris D. S. (2009) Herpes Simplex Virus Type 1 Suppresses RNA-Induced Gene Silencing in Mammalian Cells. Journal of Virology. Vol.8:6652–6663.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 31 de enero del 2012, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la **Biol. Exp. Berenice Eugenia Gil Rodríguez**

Dra. Martha Yocupicio Monroy

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dra. Rosa María del Ángel

Dra. Selene Zárate Guerra
