

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Efecto del miRNA-222 en el ciclo replicativo del virus
del dengue**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
Q.F.B. MANUEL ARTURO ESCALERA CUETO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

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

ASESORES

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

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

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

Dr. Juan Santiago Salas Benito
Profesor Titular. Posgrado en Biomedicina Molecular.
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.

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

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

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

INDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS.	i
LISTA DE TABLAS.	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	1
Infección por el virus del dengue.	1
Antecedentes históricos.	1
Ciclo infeccioso.	2
Tipos de huésped.	2
Epidemiología en América.	3
Ciclo de replicación viral.	4
Genoma viral del dengue.	5
Proteínas virales.	6
Proteínas Estructurales.	7
Proteínas No estructurales	7
Cuadro clínico.	9
Los MicroRNAs.	10

Biogénesis de los miRNAs.	11
Mecanismo de acción.	11
MicroRNAs y su función en los procesos biológicos.	12
Los MicroRNAs de mamífero como reguladores positivos en las infecciones virales.	13
ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	14
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	19
Base de datos ViTa.	20
Cuantificación de la expresión del miRNA 222 en células no infectadas e infectadas con DEN-2.	22
Cultivo primario de macrófagos humanos.	22
Cultivo primario de células dendríticas humanas.	23
Infección de los cultivos celulares con DEN-2.	24
Extracción de los miRNAs a partir de los cultivos celulares.	24
Cuantificación del miRNA-222 por RT-PCR en Tiempo Real.	26

Determinación del efecto de los mimetizadores e inhibidores de los miRNAs en la replicación de DEN-2.	27
Transfección de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 en los cultivos primarios de macrófagos humanos.	27
Extracción de RNA total de los cultivos celulares.	28
Cuantificación de RNA viral por RT-PCR en Tiempo Real.	28
RESULTADOS.	29
Predicción de los microRNAs del huésped que interaccionan con la región DB1 de la UTR 3' del genoma de DEN-2.	30
Detección del miRNA-222 en cultivos primarios de macrófagos y de células dendríticas humanas no infectadas e infectadas con DEN-2.	33
Comparación del nivel de expresión del miRNA-155 en células no infectadas e infectadas con DEN-2.	40
Comparación del nivel de expresión del miRNA 222 en células no infectadas e infectadas con DEN-2.	44
Determinación del efecto de los mimetizadores e inhibidores del miRNA 222 en la replicación de DEN-2.	47
DISCUSIÓN.	54
CONCLUSIONES.	58
BIBLIOGRAFÍA.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de replicación del virus dengue.	5
Figura 2. Flujo de la información de las bases de datos a través de ViTa.	21
Figura 3. Esquema utilizado en la extracción de miRNAs.	25
Figura 4. Interacción del miRNA-222 con la región DB1 del UTR 3' del virus DEN-2.	32
Figura 5. Detección del RNA de DEN-2 en el cultivo primario de macrófagos humanos mediante PCR en punto final.	34
Figura 6. Nivel de expresión del RNA viral en cultivo primario de macrófagos humanos.	35
Figura 7. Nivel de expresión del control de carga ciclofilina en cultivo primario de macrófagos humanos.	36
Figura 8. Nivel de expresión del RNA viral en cultivo primario de células dendríticas humanas.	38
Figura 9. Nivel de expresión del control de carga ciclofilina en cultivo primario de células dendríticas humanas.	39
Figura 10. Fracción enriquecida en RNAs pequeños.	40
Figura 11. Nivel de expresión del miRNA-155 en cultivo primario de macrófagos humanos.	42

Figura 12. Nivel de expresión del miRNA-155 en cultivo primario de células dendríticas humanas.	43
Figura 13. Nivel de expresión del miRNA-222 en cultivo primario de macrófagos humanos.	45
Figura 14. Nivel de expresión del miRNA-222 en cultivo primario de células dendríticas humanas.	46
Figura 15. Cultivo primario de macrófagos transfectados con el Pre-miRNA-Cy3.	48
Figura 16. Amplificación de ciclofilina mediante RT-PCR en las células tratadas con los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 e infectadas con DEN-2.	51
Figura 17. Amplificación del genoma del virus del dengue mediante RT-PCR en las células tratadas con los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 e infectadas con DEN-2.	52
Figura 18. Eficiencia de la replicación viral en cultivo primario de macrófagos humanos tratados con mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 e infectados con DEN-2.	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de DEN-2 incluidas en el análisis de hibridación con miRNAs de humanos realizado mediante ViTa.	31
Tabla 2. miRNAs que interaccionan con la UTR 3' en al menos 14 de las 15 cepas analizadas.	31

RESUMEN

La infección por el virus del dengue activa diversos procesos en la célula huésped, los cuales buscan inhibir el ciclo replicativo del virus y así la diseminación de la infección. Entre los mecanismos de defensa antiviral que se han descrito más recientemente, se encuentran los miRNAs, cuya función es modular la expresión genética mediante el bloqueo de la traducción y en algunos casos también la degradación de los RNA mensajeros. Las funciones asociadas a los miRNAs se inician por la interacción de dichos RNAs pequeños principalmente en la UTR 3' del transcrito blanco. En el presente trabajo, se planteó investigar el papel del miRNA-222 en el ciclo replicativo del virus del dengue, ya que mediante análisis bioinformático se predijo su interacción con la región DB1 de la UTR 3' del genoma de DEN-2, la cual es muy importante para la viabilidad viral. Primeramente, se realizó el perfil de expresión del miRNA-222 en cultivos primarios de macrófagos humanos no infectados e infectados en una cinética de 12, 24 y 36h postinfección. Los resultados obtenidos después de la detección de dicho miRNA por RT-PCR en tiempo real indican que la infección viral no produce cambios en la expresión del miRNA-222. Posteriormente se realizaron experimentos para definir el efecto que los niveles basales del miRNA-222 pudiesen llevar a cabo en el ciclo replicativo viral utilizando mimetizadores e inhibidores de la función de dicho miRNA. Para tal propósito, las células se transfectaron con los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222, se infectaron con DEN-2 y se determinó la eficiencia de replicación del virus mediante RT-PCR semicuantitativa. Los resultados mostraron que los mimetizadores no causaron efecto en la eficiencia de replicación viral, sin embargo, los inhibidores la aumentaron significativamente. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el miRNA-222 podría estar inhibiendo la eficiencia replicativa del virus del dengue en los cultivos primarios de macrófagos humanos.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

Infección por el virus del dengue

Antecedentes históricos

La fiebre del dengue DF (del inglés Dengue Fever) es producida por el virus del dengue, el cual es transmitido al humano por la picadura del mosquito vector del género *Aedes*. Se tienen reportes de epidemias reportadas en el este de la India desde 1635 y en 1699 en Panamá. A finales de 1700, la infección tuvo una distribución en los trópicos, con epidemias de compatibilidad clínica con la enfermedad en 1779 en Batavia, Indonesia y El Cairo, Egipto, y en 1780 en Estados Unidos en los estados de Filadelfia y Pensilvania.

La etiología del virus del dengue no fue documentada hasta 1944 cuando científicos japoneses y americanos simultáneamente aislaron el virus de soldados en el Pacífico y Asia. Los virus de La India y Hawai nombrados como dengue 1 (DEN-1) y una cepa de Nueva Guinea como dengue 2 (DEN-2) asignándose como virus prototipo del DEN-1 a la cepa Hawaii, y DEN-2 a la cepa Nueva Guinea. Después dos serotipos más, nombrados dengue 3 (DEN-3) y dengue 4 (DEN-4) se aislaron por William Hammon. Aunque existen miles de virus dengue aislados de varias partes del mundo a través del tiempo, todos se han clasificado antigénicamente dentro de estos cuatro serotipos (1).

Los trabajos de H. Graham en 1903 indicaban que el virus del dengue era transmitido por mosquitos, pero fue hasta 1906 que T.L. Bancroft demostró la transmisión viral por *Aedes aegypti* y posteriormente se supo que éste era el principal mosquito vector urbano del virus del dengue. Estudios posteriores en las Filipinas, Indonesia, Japón y el Pacífico dieron a conocer a *Aedes albopictus* y *Aedes polynesiensis* como vectores eficientes secundarios del virus del dengue (2).

El incremento en la urbanización y el movimiento de la gente dentro y entre las diferentes regiones del mundo vía aérea ha resultado en un aumento de movimiento del virus dengue entre la población, incrementando la frecuencia de las epidemias, el desarrollo de hiperendemicidad (co-circulación de múltiples serotipos) y el surgimiento de la fiebre de dengue hemorrágico DHF (del inglés Dengue Hemorrhagic Fever) y síndrome de choque por dengue DSS (del inglés Dengue Shock Syndrome) principalmente en países del sureste de Asia en 1960.

Ciclo infeccioso

El virus del dengue existe en la naturaleza en tres ciclos básicos:

- El ciclo primitivo del bosque, que involucra al mosquito canopy dwelling y primates inferiores.
- Un ciclo rural, primordialmente en Asia y el Pacífico, en el que se involucran mosquitos peridomésticos (*Ae. albopictus* y *Ae. scutellaris* spp.) y humanos.
- El ciclo urbano, el cual es el más importante epidemiológicamente y de impacto para la salud pública en México, involucra al mosquito *Ae. aegypti* y humanos.

Los virus se mantienen en la mayoría de los centros urbanos de los trópicos con epidemias en diferentes periodos del año, con un aumento de los brotes de dengue en la época de lluvia (1).

Tipos de huésped

Se conocen solamente tres huéspedes naturales del virus del dengue: el mosquito *Aedes*, primates inferiores y humanos, en el que la viremia puede durar de 2-12 días (en promedio, 4-5 días). Las evidencias experimentales muestran que varias especies de primates inferiores (chimpancé, gibones y macacos) son infectados y desarrollan títulos de viremia suficientemente elevados para infectar mosquitos pero no desarrollan la enfermedad (1).

El virus dengue causa síntomas clínicos y enfermedad solamente en humanos. Los ratones neonatos, que se usan para el aislamiento viral generalmente no muestran signos de la enfermedad después de la inoculación intracerebral con la mayoría de las cepas sin pasajes de virus dengue. Sin embargo, algunas cepas pueden adaptarse en el laboratorio para producir enfermedad y muerte en los ratones neonatos.

Solamente las especies del género *Aedes* parecen ser el vector natural del mosquito para el virus dengue. Así, las especies del subgénero *Stegomyia* son los más importantes en términos de transmisión humana, el cual incluye *Ae. Aegypti*, como principal vector urbano del dengue a nivel mundial y *Ae. albopictus* vector en Asia-Américas entre otras. Las especies de mosquito comúnmente usadas para la propagación "in vivo" incluyen *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Toxorhynchites spp.*

Epidemiología en América

La primera epidemia de fiebre del dengue en América ocurrió en Cuba en 1977-78 y fue causada por DEN-1, posteriormente se presentó la primera epidemia de DHF en 1981 y fue causada por DEN-2. Interesantemente en esta última, las infecciones secundarias por dengue fueron 99% de los casos reportados, por lo que se estableció un programa de control especialmente enfocado a la erradicación del mosquito vector, el cual permitió la ausencia de casos de dengue en Cuba durante 16 años.

Durante las últimas dos décadas la incidencia de la fiebre del dengue ha incrementado significativamente en esta región. En el 2002, más de 30 países de Latinoamérica reportaron alrededor de un millón de casos de DF y 17,000 casos de DHF, de los cuales 225 fueron fatales (2).

México se encuentra entre los principales países afectados por la enfermedad del dengue, tan solo en la década de 1995 a 2005 se reportó que los casos ascienden a alrededor de 10,000 durante este periodo.

En el año 2006 se reportaron 24,661 casos de DF y 5,175 de DHF se en la población en general, teniendo el pico más alto de casos en los meses que comprenden la temporada de lluvia. En el año 2007, se reportaron 22,485 casos de DF y 4,390 casos confirmados de DHF, mientras que en el año 2008

a la semana 27 se han reportado 9,064 casos de DF y 1973 casos confirmados de DHF. (4).

Ciclo de replicación viral

El virus dengue se une a la célula huésped mediante su interacción con proteínas de la superficie celular entre las que se han descrito distintos candidatos en diversas líneas celulares estudiadas como son: CD209 en células dendríticas, Heparán sulfato en células Vero y BHK, así como HSP70 y 90 y moléculas asociadas a CD14 en monocitos humanos (5,6).

Los viriones son internalizados por los receptores mediante endocitosis, posteriormente el ambiente ácido del endosoma activa la trimerización irreversible de la proteína E lo que resulta en la fusión de las membranas celulares y virales para que se lleve a cabo la liberación de la nucleocapside al citoplasma celular a la vez que la proteína de la cápside y el RNA se disocian. Enseguida el genoma viral que es un RNA de polaridad positiva se traduce a una poliproteína que se procesa por proteasas virales y del huésped (7,8).

Una vez que se han producido las proteínas virales, el RNA del virus se replica a una cadena intermediaria de polaridad negativa que sirve como templado para la producción de grandes cantidades de la progenie de polaridad positiva.

El proceso de replicación del genoma ocurre en las membranas intracelulares, mientras que el ensamblaje del virus ocurre en la superficie del RE cuando las proteínas estructurales y el RNA recién sintetizado geman en el lumen del mismo.

Como se muestra en la figura 1, inicialmente las partículas inmaduras se forman en el lumen de el retículo endoplasmico (RE), dichas partículas contienen a las proteínas E, prM, C, y al genoma, los cuales constituyen al virus no infecciosos. Posteriormente, el corte de prM se lleva a cabo en la red del trans-Golgi lo que conduce a la formación de las partículas virales maduras infecciosas. Cabe mencionar que los virus deben sufrir posteriormente modificaciones postraduccionales para finalmente ser liberadas de la célula por exocitosis (6).

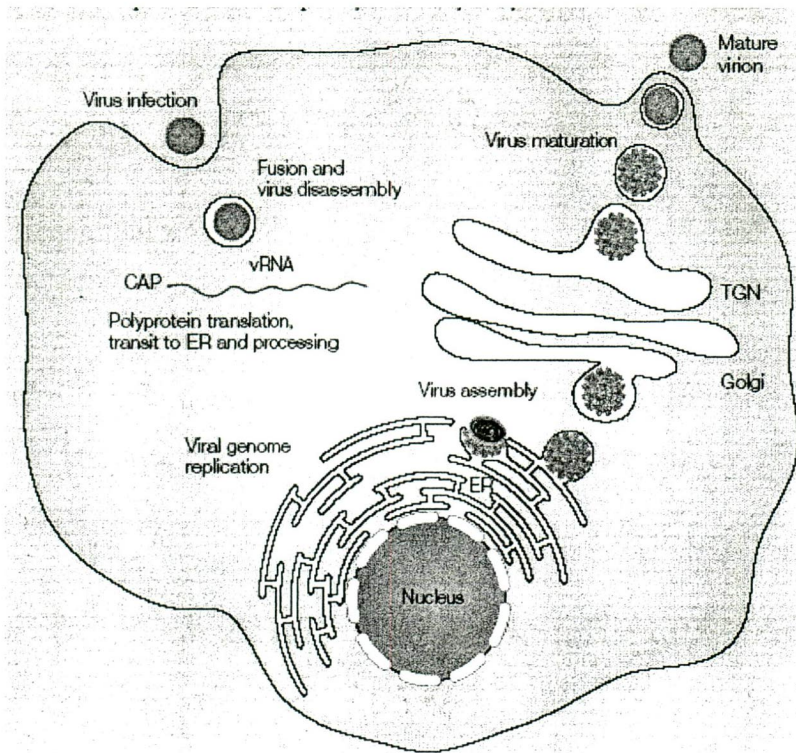


Figura 1. Ciclo de replicación del virus dengue (6).

Genoma viral del dengue

El virus dengue consiste de un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva envuelto por una nucleocápside icosaédrica. El genoma viral es de aproximadamente 11kb de longitud y tiene un marco de lectura abierto, ORF (del inglés Open Reading Frame), el cual está flanqueado por las regiones no traducidas, UTR (del inglés Untranslated Region) 5' y 3' con una longitud de aproximadamente 100 y 600 nucleótidos respectivamente. El ORF codifica para una poliproteína de alrededor de 3400 aminoácidos que es procesada en proteínas individuales clasificadas como estructurales y no estructurales (NS) ordenadas en el genoma como sigue: C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (8).

Las UTRs del genoma de los flavivirus se han postulado como regiones de importancia en la viabilidad viral, principalmente por su participación en la traducción y replicación del genoma viral. La UTR 3' se conforma por tres regiones: una región variable (VR) inmediatamente del codón de paro 3', una región core río abajo del VR y una región 3' terminal, la cual contiene la

secuencia de circularización (CS) y una orquilla de longitud estable llamada SL 3' (del inglés Stem Loop). La UTR 3' esta implicada en la circularización del genoma a través de la interacción de la secuencia del mismo nombre con la región 5' terminal. También se ha determinado que la función de la UTR 3' de los flavivirus depende tanto de la secuencia primaria como de la estructura secundaria (9).

La gran importancia adjudicada a la UTR 3' en la replicación del virus se demostró deletando o mutando regiones específicas de la UTR 3' de DEN-4 causando una distorsión importante en la estructura secundaria sin abolir la viabilidad del virus, ya que fue posible recuperar virus viables de las líneas celulares Vero y C6/36. Sin embargo, al mutar la región CS la viabilidad se pierde casi por completo (9,10).

Otra región dentro de la UTR 3' que ha mostrado ser muy importante en la viabilidad viral es la región DB1, debido a que en experimentos realizados por Durbin y cols. la mutación de dicha región genera virus con características de atenuación. El hallazgo anterior adquiere mayor importancia debido a que dichos virus mutantes pudieran servir como candidato vacunal, aunque esto solo ha tenido éxito para DEN-4, ya que en el resto de los serotipos la mutación de la DB1 causa la generación de partículas virales no viables a la infección y en consecuencia no se puede obtener la respuesta inmune adecuada lo cual es indispensable en la generación de una vacuna (11).

Proteínas virales

La nucleocápside que contiene al genoma está cubierta por una envoltura lipídica, la cual deriva de membranas celulares del huésped de donde emerge el virus. El virión completo tiene alrededor de 50nm de diámetro y contiene tres proteínas estructurales: proteína del core de la nucleocápside (C), una proteína asociada a membrana (M), la proteína de la envoltura (E). El virus codifica para siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, y NS5) que llevan a cabo distintas funciones necesarias para la replicación viral (1,3).

Proteínas Estructurales

Proteína de la cápside (C): es una proteína básica de aproximadamente 11 kDa que interacciona con el genoma viral para formar la nucleoproteína. Los residuos cargados positivamente están agrupados en el extremo amino y carboxilo, separados por una región hidrofóbica interna que media la asociación a la membrana viral (12).

Proteína de membrana (M): la proteína M (7-9 kDa), se produce inicialmente como precursor de aprox. 26 kDa llamada prM que se transloca al RE por el dominio hidrofóbico del carboxilo terminal de la proteína C. La forma inmadura prM se encuentra presente en viriones inmaduros o intracelulares. Una de las funciones de la proteína prM es la de formar heterodímeros con la proteína E para evitar que esta última sufra cambios conformacionales en compartimentos ácidos durante el proceso de exocitosis viral.

Proteína de la envoltura (E): es el componente principal proteína de la superficie en los viriones de los flavivirus. Es una proteína de aproximadamente 53 kDa que interviene en procesos como: fusión de membranas e interacción con receptores específicos de la célula huésped. Es el antígeno viral más importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes. Las variaciones en esta proteína definen a los cuatro serotipos (12).

Proteínas No estructurales

Proteína NS1: a diferencia de las otras glicoproteínas codificadas por el virus dengue, NS1 (46kDa) no forma parte del virión pero se encuentra en la superficie de las células infectadas. Evidencias preliminares sugieren que NS1 tiene un papel en la replicación viral debido a su localización en los sitios de replicación del RNA viral además de que la mutación de los sitios de glicosilación cercanos al amino terminal pueden disminuir en gran medida la replicación y la producción del virus.

Proteínas NS2A y NS2B: la proteína NS2A (22kDa) es hidrofóbica y se genera por el corte de NS1-2A por una serin proteasa del ER. Khromykh y cols. observaron que la proteína NS2A de virus Kunjin se localiza en el sitio

subcelular de replicación de este flavivirus e interactúa con componentes de la replicasa NS3 y NS5 (14, 15).

Proteína NS3: es una proteína multifuncional (70kd) con motivos de RNA helicasa que está involucrada en la replicación del RNA viral. Como en los otros miembros de la familia *flaviviridae*, la región C-terminal de esta proteína presenta una homología con el supergrupo 2 de las helicasas de RNA (15). La interacción de esta proteína con el RNA fue demostrada por Warrener y cols., quienes probaron la actividad de ATPasa en presencia de RNA (16).

Proteínas NS4A y NS4B: la función de NS4A (aprox. 16 kDa) en la replicación del RNA viral es apoyada por la colocalización de esta proteína en los complejos de replicación así como su interacción con NS1 (15), mientras que la proteína NS4B (aprox. 27 kDa) colocaliza con NS3 y RNA de doble cadena en los sitios de replicación viral (18).

Proteína NS5: es una proteína multifuncional con actividad de metiltransferasa (MTasa) y actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Mediante análisis bioinformático de la región amino terminal de NS5 se encontró que exhibía homología con S-Adenosilmetionina (SAM)-dependiente de MTasa, sugiriendo que esta proteína está involucrada en las modificaciones necesarias para generar el extremo 5'cap del genoma viral (19). Estudios bioquímicos demostraron que el guanosintrifosfato (GTP) se une con un alta especificidad a NS5 y lo cual se sustentó con ensayos de mutagénesis de estos sitios de unión a GTP, que resultan letales para la replicación de DEN-2 (20).

La actividad de RdRp se ha demostrado con recombinantes de NS5 en ensayos "in vitro" donde el producto principal resulta frecuentemente en la síntesis de RNA por el mecanismo de "copy back". Sin embargo, la iniciación "de novo" en la síntesis de RNA ha sido demostrada con la proteína recombinante NS5 de DEN-2 que probablemente refleja el modo de iniciación de la replicación usado por el virus de forma natural (21). La mutagénesis del sitio de actividad de RdRp en el virus Kunji confirma la función esencial para la replicación del virus debido a que la viabilidad de la infección cae dramáticamente (22). Se ha demostrado que la proteína NS5 forma un complejo con NS3 y mediante ensayos de entrecruzamiento se muestra que es posible la unión de ambas proteínas a la región SL3' del genoma viral (23, 24, 25).

Cuadro clínico

El virus del dengue puede provocar diferentes cuadros clínicos que se clasifican dependiendo de la severidad de la infección pudiendo ser asintomáticas, fiebre no diferenciada, fiebre por Dengue, fiebre hemorrágica por Dengue o síndrome de choque por Dengue. Estas formas clínicas pueden producirse por cualquiera de los cuatro serotipos del virus (3,26).

- FIEBRE NO DIFERENCIADA (UF, del inglés Undifferentiated Fever): ésta usualmente se produce por una infección primaria pero puede también ocurrir durante una infección secundaria. Clínicamente es una forma indistinguible de otras infecciones virales (3).
- FIEBRE POR DENGUE: se presenta durante infecciones primarias o secundarias. Los síntomas son fiebre elevada, dolor de cabeza severa (especialmente en el área retro-orbital), artralgia, mialgia, anorexia y a veces un “rash” maculo-papular. El rubor, un rasgo característico es observado en el rostro, cuello y pecho. Si bien, las manifestaciones hemorrágicas no son comunes en la fiebre por Dengue, petequias/púrpura, sangrado gastrointestinal, epistaxis y sangrado gingival han sido observados en algunos individuos (3, 27, 28).
- FIEBRE HEMORRÁGICA Y SÍNDROME DE CHOQUE POR DENGUE: usualmente sigue a infecciones secundarias por Dengue, pero a veces puede seguir a infecciones primarias, especialmente en infantes. La DHF se caracteriza por fiebre elevada, fenómenos hemorrágicos y síntomas que denotan falla circulatoria (3).

Existe controversia acerca de la patogénesis de DHF/DSS, pero los dos están asociados a la infección severa por dengue. El clásico DHF/DSS se caracteriza por un síndrome de fragilidad vascular, el cual puede evolucionar a choque hipovolémico y muerte. Se piensa que la patogenicidad producida por este síndrome es debido al fenómeno de respuesta inmune exacerbada generada por la formación del complejo del virus con anticuerpos contra dengue en concentraciones subneutralizantes y este a su vez potencia la

infección de fagocitos mononucleares, los cuales producen un mediador vasoactivo responsable del aumento en la permeabilidad vascular.

La principal característica asociada con el surgimiento de DHF y DSS en un área es la presencia de hiperendemicidad, lo que incrementa la probabilidad de infecciones secundarias. Por otro lado la hiperendemicidad es también asociada con el incremento del movimiento de los virus entre la población, lo cual incrementa la probabilidad de introducción o de selección genética de cepas virales que tengan un mayor potencial de virulencia.

Otro tipo de infección severa y fatal por dengue es la encefalopatía, que aunque no se categoriza como encefalitis viral, existen datos que sugieren que los síntomas neurológicos podrían ser secundarios a hemorragia cerebral, edema u otros efectos indirectos de la infección por dengue (3).

Los MicroRNAs

Los MicroRNAs (miRNAs) son moléculas pequeñas de RNA las cuales han sido implicadas como elementos regulatorios en la compleja red de regulación de genes en eucariontes. Estos RNA pequeños, son procesados a partir de transcritos de regiones no codificantes del genoma en una sola cadena de RNA que tiene una longitud de 18 a 25 nucleótidos y se han implicado en la regulación traduccional de los RNA mensajeros (mRNA) en un mecanismo que requiere la unión a éstos inhibiendo su traducción. Se han identificado aproximadamente 500 genes que codifican para microRNAs en el genoma humano y cada uno de estos miRNAs se estima que interactúa con 5 - 10 mRNAs aproximadamente (29).

El miRNA *lin-4* fue identificado en 1980, cuando una mutación que daba una pérdida de función en el nematodo *Caenorhabditis elegans* dio como resultado organismos con diferente tiempo post-embrionario comparado con el nativo; trece años después se observó que *lin-4* se unía a las regiones UTR 3' de los transcritos que codifican para proteínas con funciones importantes para el desarrollo adecuado del organismo así se les adjudicó un papel en la regulación de los genes de nematodos (30). Siete años después, se descubrió al miRNA *let-7* que resultó altamente conservado en eucariontes y a partir de este

hallazgo surgieron investigaciones que arrojaron la detección y caracterización de nuevos microRNAs en diferentes organismos incluyendo humanos (31).

Biogénesis de los miRNAs

En células de mamífero, los transcritos primarios de miRNAs (pri-miRNAs) son generados en forma de mensajeros largos y policistrónicos que funcionan a manera de precursor de miRNAs con estructura de orquilla. Los pri-miRNAs se procesan en el núcleo a precursores (pre)-miRNAs por la ribonucleasa Drosha, con ayuda del microprocesador y exportador del núcleo Exportina-5. Los precursores de 60 a 90 nucleótidos forman estructuras de tallo y burbuja, y la enzima citoplasmática Dicer (RNasa III), corta el miRNA en la región tallo-burbuja lo que resulta en miRNA maduros.

Por último, el miRNA maduro es incorporado dentro de una ribonucleoproteína para formar el RISC (del inglés RNA-Induced Silencing Complex) el cual lleva a cabo el silenciamiento relacionado con RNA interferentes. La proteína Argonauta I (AGO I) es esencial en la vía de los miRNAs, siendo la endonucleasa que corta el mRNA al que se une el miRNA flanqueado por RISC (32).

Mecanismo de acción

En algunos casos, la formación del dsRNA que se produce por la unión de los miRNAs a sus blancos, dispara la degradación del transcrito, aunque también se piensa que el mecanismo de acción de los miRNAs es mediante el bloqueo de la unión de la maquinaria de traducción al transcrito, previniendo así su traducción, lo que causa que el RNA sea degradado, inhibiendo la expresión de la proteína para la cual codifica ese mRNA en específico.

Generalmente en sistemas de mamíferos, los microRNAs unen a sus blancos con una complementariedad incompleta o parcial, y este hecho hace que un mismo miRNA se pueda unir a más de un mRNA y que a su vez más de un miRNA actúe sobre un mRNA al mismo tiempo. De esta forma, el descubrimiento de los miRNAs ha revolucionado el entendimiento de la regulación genética en la era postgenómica (33).

Lo anterior sugiere que el mecanismo de regulación por microRNAs es dinámico. Recientemente se ha determinado mediante análisis bioinformático que el genoma humano completo puede estar regulado del 10% al 30% por microRNAs. La red regulatoria de la interacción miRNA-mRNA es más compleja de lo que se puede llegar a pensar, ya que como se mencionó existe una multiplicidad y cooperatividad de los diferentes sitios blanco de los microRNAs (29,32).

Los MicroRNAs y su función en los procesos biológicos

La importancia de los miRNAs en el desarrollo, proliferación y muerte celular, así como en morfogénesis ha sido demostrada en *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, y *Arabidopsis thaliana* (33,34). En vertebrados, los miRNAs específicos de células embrionarias y los miRNAs expresados en células de linaje hematopoyético han sido clonados en ratón. Uno de estos miRNAs, el miR-181, mostró tener un efecto en el incremento de las células que se diferencian al linaje de células B cuando se expresa ectópicamente en células progenitoras hematopoyéticas (35).

Por otro lado, existen reportes que indican que los miRNAs pueden estar involucrados en cáncer en humanos por la frecuente pérdida en la expresión de miR-15 y miR-16. En leucemia linfocítica crónica debido a que los blancos predichos para estos miRNAs se encuentran implicados en este tipo de leucemia como la proteína 17 de unión a formina entre otros (36).

Debido al análisis a gran escala por medio de microarreglos se ha podido concluir que la desregulación en la expresión de los miRNAs está implicada en muchos tipos de cáncer como el de pulmón (let-7, miRNA-155 y 210), tumores hematopoyéticos (miRNA-222), cáncer de mama (miRNA-155) entre otros (36,37).

Recientes investigaciones muestran que cerca del 50% de los sitios predichos para los miRNAs dentro del genoma se localizan en sitios conocidos como "frágiles" los cuales se asocian con el cáncer. Lo anterior demuestra la importancia de seguir estudiando los posibles blancos de los miRNAs como posible herramienta para el pronóstico y diagnóstico del cáncer (38).

Los MicroRNAs de mamífero como reguladores positivos en las infecciones virales.

Jopling y cols. reportaron que la expresión tejido específica del miRNA-122 favorece la infección tejido específica por el virus de la hepatitis C. Dicho microRNA es específico de hígado y se expresa en altas concentraciones con respecto al resto de los miRNAs del mismo tejido, promoviendo la acumulación del RNA viral debido a su unión a la región UTR 5' del genoma viral. El silenciamiento de este miRNA resulta en la pérdida de la viabilidad del virus en dicho tejido. Lo anterior refleja que el miR-122 es requerido para una eficiente replicación de este virus y en consecuencia para la infección (39).

O'Connell y cols. describieron que el miRNA-155 se produce en macrófagos que son estimulados con un intermediario viral sintético de RNA de doble cadena, activando la producción de una citocina de respuesta antiviral e IFN- β , lo que sugiere que el miRNA 155 puede estar implicado en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria de la célula infectada. Sin embargo, no se ha demostrado a la fecha que dicha inducción se produzca con la infección de algún virus (40).

ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

Los MicroRNAs como un mecanismo de defensa antiviral.

Los virus son parásitos intracelulares obligados y usan la maquinaria celular para su supervivencia y replicación. El éxito de los virus depende en gran parte de su habilidad para usar efectiva y eficientemente la maquinaria del huésped para su propagación. Existen datos recientes de que los RNAs de origen viral son blanco del mecanismo de regulación por miRNAs y dichos datos van en aumento. Se postula que la expresión tejido específica de los miRNAs probablemente contribuyan al tropismo de los virus (41).

La participación de los microRNAs en el ciclo replicativo de los virus se ha demostrado en trabajos como el de Lecellier y cols., quienes por primera vez demostraron que un microRNA de mamífero, miR-32, restringe la acumulación del retrovirus PFV (del inglés Primate Foamy Virus) en células de mamífero. PFV es un retrovirus que se utiliza como modelo de estudio Virus de Inmunodeficiencia Humana, en el que mutantes del virus que carecían de los sitios de unión para miR-32 en el RNA viral resultan en la acumulación mucho más rápida del virus en células infectadas comparado con el comportamiento de la cepa original de PFV. Así se demostró que dicho microRNA inhibe la replicación de PFV. También se demostró que la proteína TAS del PFV puede actuar como represor no específico de RNA de interferencia, pues en mutantes donde se les deleta esta proteína, el virus es incapaz de infectar a la célula (42).

Por lo anterior se pudo concluir la participación de los microRNAs en un mecanismo de defensa contra el virus y se postula que puede evadir este mecanismo mediante la expresión de supresores de los miRNAs.

Skalsky y cols describieron un miRNA viral al que nombraron KSHV-miR-K12-11, codificado por el virus del herpes tipo 8 causante del sarcoma de kaposi. Dicho miRNA viral es ortólogo con el miRNA-155 de humano y comparte blancos de mRNA celulares que están implicados en apoptosis y en diferenciación celular entre otras funciones que son regulados por el miRNA 155. De manera importante se pudo comprobar que la infección de las células con este virus herpes causa la represión de la expresión del miRNA-155 por acción del miR-K12-11, llevando a si una regulación de los mRNA blancos y

causando la modificación del ciclo de diferenciación celular normal en las células infectadas, originando características morfológicas compatibles con células de linfoma primario (43).

Recientemente Murakami y cols. demostraron que el miRNA 199a tiene una secuencia blanco en el dominio II de la UTR'5 en el virus de la hepatitis C, mientras que el miRNA-136 muestra una secuencia blanco en NS3, la cual es una proteína viral con actividad de RNA helicasa. Ambos miRNAs regulan de manera negativa la replicación viral cuando se sobre expresan en células infectadas con el virus de la hepatitis C y se muestra un efecto contrario cuando la expresión de miRNAs es inhibido en células infectadas. El efecto de dichos miRNAs se ha provado tanto en modelo de replicón viral como en el virus mismo (44).

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La función que los miRNAs del huésped pueden tener en el ciclo replicativo de los virus. La interacción entre diversos virus y los miRNAs es un área que está siendo estudiada por varios grupos de investigación alrededor del mundo debido a la participación de los miRNAs en la regulación de la expresión de moléculas del huésped ó del virus figurando como factores importantes a considerar en la relación huésped-parásito.

Cabe mencionar, que aunque se ha probado experimentalmente la importancia de la UTR 3' en el proceso de replicación del virus del dengue, no se ha reportado a la fecha si existe una interacción de los miRNAs del huésped con esta región del genoma viral y cual sería la implicación de esta interacción en el ciclo replicativo.

Así, el mejor entendimiento de la interacción del virus dengue con la maquinaria regulatoria de los miRNAs en humanos podría utilizarse para inhibir los mecanismos de infección y replicación viral, lo que daría paso en un futuro a una nueva forma de terapia contra la infección por el virus del dengue.

HIPÓTESIS

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

- La unión del miRNA 222 en la región DB1 UTR'3 del DEN 2 inhibe la replicación viral.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el papel del miRNA 222 en el ciclo replicativo del virus del dengue 2.

Objetivos particulares

Predecir los miRNAs que se unen a la DB1 UTR 3' del genoma del virus DEN-2 mediante análisis bioinformático.

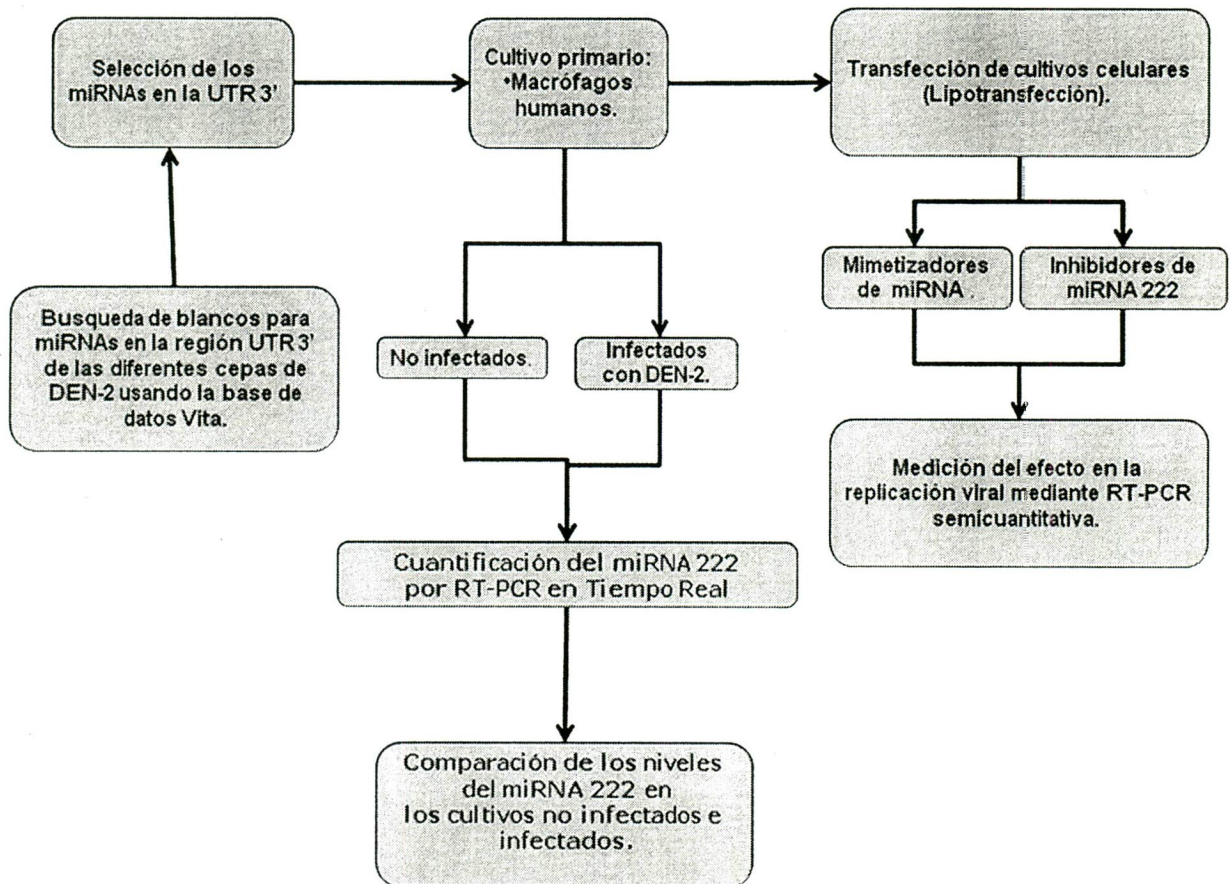
Cuantificar la expresión del miRNA 222 en células infectadas y no infectadas.

Determinar el efecto de los mimetizadores del miRNA 222 en la replicación del virus del dengue 2.

Determinar el efecto de los antagonistas del miRNA 222 en la replicación del virus del dengue 2.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

El diagrama de la estrategia general es el siguiente:



Base de datos ViTa.

La base de datos ViTa predice los microRNAs que podrían interactuar en los genomas de 23 familias de virus lo cuales se clasifican en seis tipos de genomas: virus de dsDNA, ssDNA, dsRNA, (+) ssRNA, (-) ssRNA y virus retrotranscribibles. Los genomas y secuencias de los virus se obtienen de NCBI (Nacional Center for Biotechnology Institute), ICTVdb (International Committee on Taxonomy of Viruses), VBRC (Viral Bioinformatics Resource Center) y VirGen (Viral Genomes). Las secuencias blanco de los miRNAs en los genomas virales se obtienen de programas de predicción anteriormente desarrollados como: TargetScan, miRanda y RNAhybrid los cuales son comúnmente usados para determinar el sitio de hibridación en los RNAm más favorable energéticamente.

En la figura 2 se representa el flujo de generación de datos de ViTa, y comprende tres pasos: colecta de información de las bases de datos que se alimentan de reportes en la literatura, selección de la información de los datos colectados y la búsqueda de las secuencias, y por último predice los miRNA del huésped que podrían interactuar con los RNAs de origen viral. Finalmente, reporta la relación entre los miRNAs y las secuencias virales, además incluye información general del virus, los tejidos que infecta y la expresión de los miRNAs en diversos tejidos (45).

Como parte del presente proyecto de tesis se hizo la predicción de los miRNAs de humano que podrían interactuar con la UTR 3' del genoma de DEN-2.

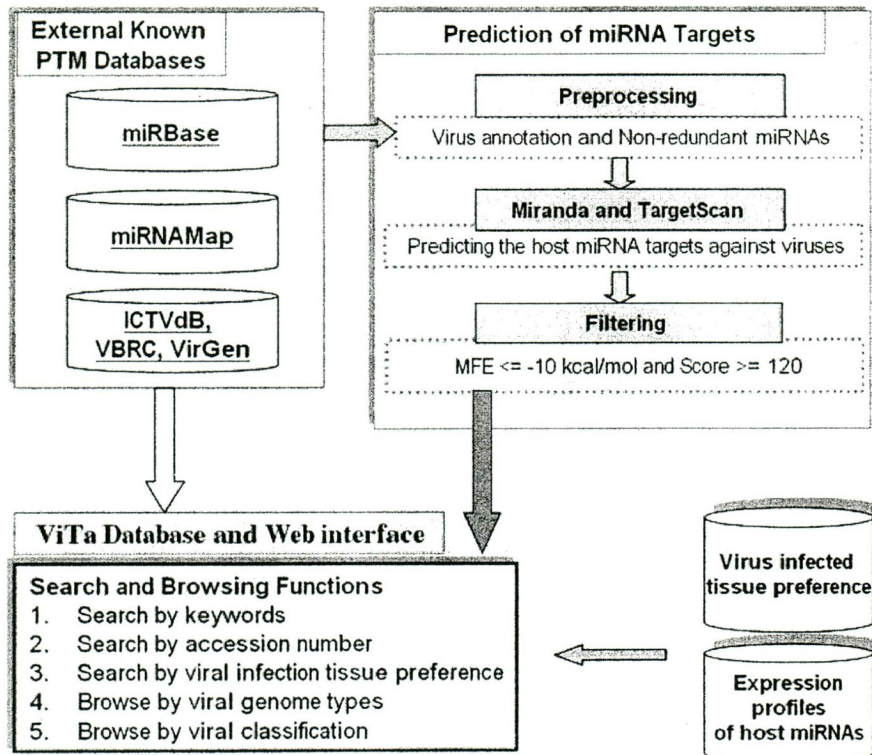
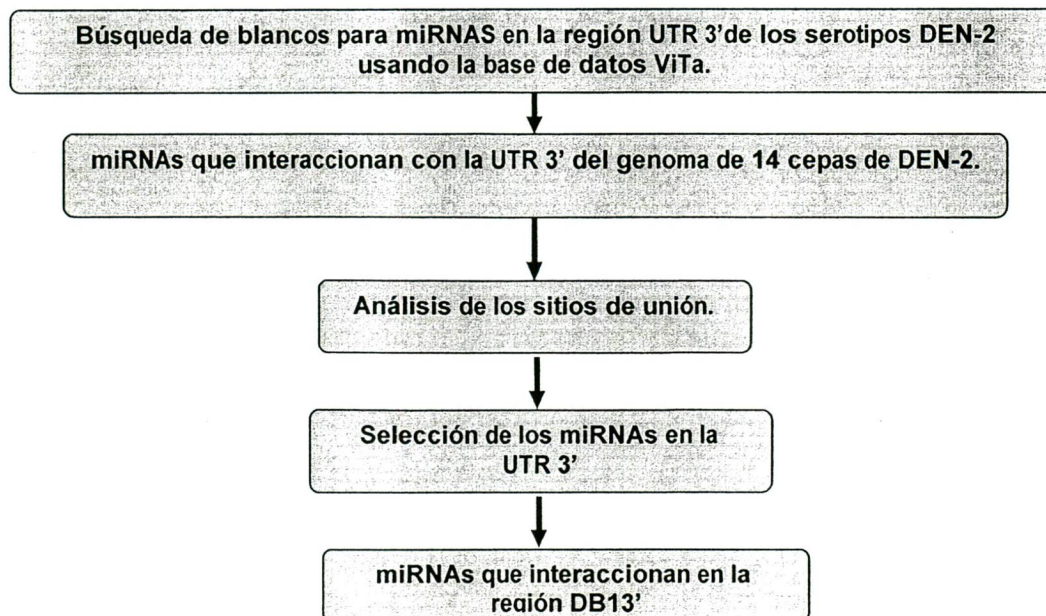


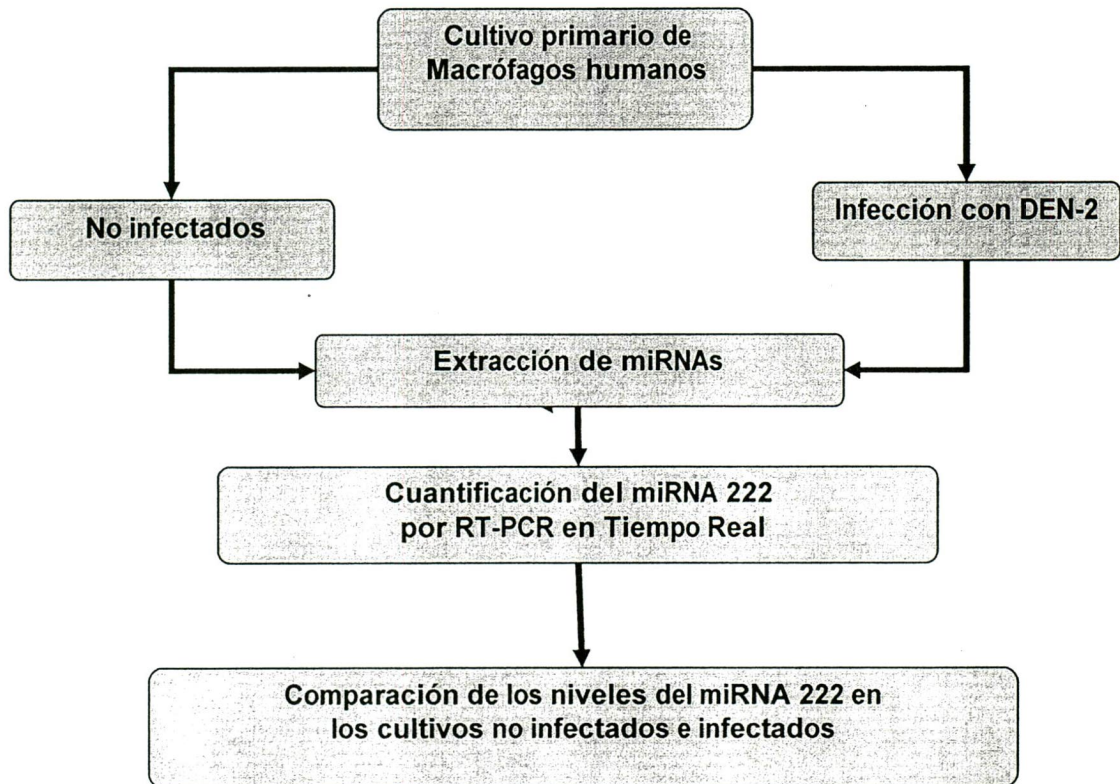
Fig 2. Flujo de la información de las bases de datos a través de ViTa (44).

La estrategia bioinformática que llevó a cabo se muestra en el siguiente diagrama:



Cuantificación de la expresión del miRNA 222 en células no infectadas e infectadas con DEN-2.

La cuantificación de la expresión de los miRNAs en células no infectadas e infectadas con DEN-2 se realizó como se indica en el siguiente diagrama:



Cultivo primario de macrófagos humanos.

A cada paquete sanguíneo se le adiciona un volumen igual de PBS IX estéril, homogenizar suavemente. Adicionar en partes iguales a tubos falcon con 10 ml. de Ficoll. Centrifugar a 2,200 rpm por 25 minutos. Colectar la fase intermedia (paquete leucocitario), centrifugar a 1,200 rpm durante 10 minutos, decantar el sobrenadante. Adicionar PBS IX a la pastilla, homogenizar y tomar una alícuota para el recuento en la Cámara de Neubauer. Resuspender en buffer de columna y homogenizar, adicionar 20 μ l de perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-CD14 y homogenizar, posteriormente incubar a 4°C por 15 minutos. Adicionar buffer de columna (0.035g de EDTA en 50ml de PBS 1X) y centrifugar a 1,200 rpm por 10 minutos. Retirar el sobrenadante y adicionar buffer de columna. Para recuperar las células CD14+, se adiciona a la columna en volumen de 1ml de la siguiente manera: buffer de columna, muestra, buffer de columna y PBS 1X 15% suero fetal bovino frío. Se realiza un segundo recuento de las células para cultivar los monocitos obtenidos se cultivaron en medio RPMI 1640 Advanced (Gibco-BRL) suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, 10% de suero fetal bovino certificado, penicilina estreptomycin (Gibco) y 2mM/ml de glutamina (pH=7).

Cultivo primario de células dendríticas humanas.

Los monocitos obtenidos se cultivaron con medio RPMI suplementado con 300 U/ml de GM-CSF y 150 U/ml de IL-4 (Preprotech). El medio de cultivo se cambio cada tercer dia con medio completo conteniendo la concentración de citocinas ya mencionadas. Las células se utilizaron para los ensayos después de 10 días de cultivo.

Infeción de los cultivos celulares con DEN-2.

Las células del cultivo primario de macrófagos así como las células dendríticas se infectaron con virus DEN-2 a una moi de 10 por 2 hrs a 37°C. Se retira el virus y se lavan con medio fresco. Los cultivos infectados se dejan progresar por 12, 24 y 36 hrs antes de realizar la extracción de los RNAs.

Extracción de los miRNAs a partir de los cultivos celulares.

Para la extracción de los miRNAs se utilizó el protocolo de “mirVana isolation kit” (Ambion) que está optimizado para la obtención de RNAs pequeños en donde enriquecen los miRNAs. El cultivo primario de macrófagos humanos se sembró en placas de 60 mm con una densidad de 3×10^6 células por placa. Las células tratadas en cada una de las condiciones de infección se rompen en 600µl de solución de lisis, la cual estabiliza el RNA e inactiva RNAsas.

El lisado se mezcla con 60µl del aditivo de homogenización y se incuba por 10 min en hielo. Posteriormente el lisado se somete a una extracción ácida fenol:cloroformo, para remover la mayoría de los componentes celulares y el DNA, dejando un RNA semipuro, el cual se encuentra en la fase acuosa. Posteriormente se adiciona 600µl de fenol ácido: cloroformo y se mezcla en vortex por 1 min. Se centrifuga 10 min a 10,000g a temperatura ambiente, se toma la fase acuosa la cual se hace pasar por un filtro de fibra de vidrio, se centrifuga a 10,000 rpm por 15 seg, la fracción eluída contiene a los miRNAs. El volumen eluído se trata con 2/3 de etanol al 100%, se mezcla y se pasa por una segunda columna centrifugando en las mismas condiciones. Se realiza un lavado con 700µl de solución de lavado 1, se centrifuga a 10,000g y luego se hacen dos lavados similares de 500µl con solución de lavado 2/3. Los miRNAs pequeños se eluyen de la columna aplicando 100µl de agua libre de nucleasa precalentada a 95°, se centrifuga a 10,000g por 30 seg. Por último se colecta la elusión y se guarda a -70°C. El diagrama de flujo del procedimiento a seguir para la purificación de los miRNAs se muestra en la (Fig. 3).

El RNA total del lisado de las células tratadas en las diferentes condiciones se recupera de la siguiente manera: después de la elusión de los miRNAs de la primera columna, el RNA total retenido en el filtro se eluye mediante el procedimiento descrito para la recuperación de los miRNAs, el cual incluye los lavados y el procedimiento de elusión. Este RNA total se utilizará para la detección del genoma viral mediante RT-PCR en tiempo real y así determinar la infección de las células tratadas.

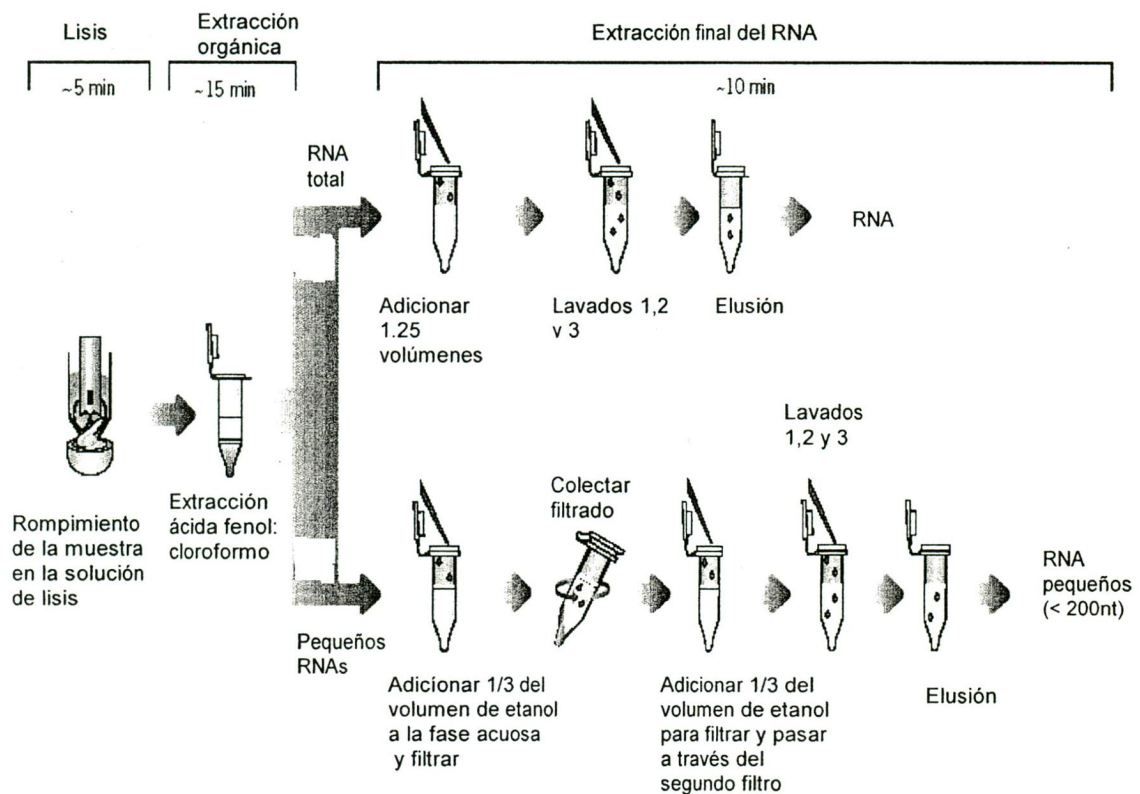


Fig. 3 Esquema utilizado en la extracción de miRNAs.

Para analizar la cantidad y calidad de los pequeños RNAs colectados se separan 10µl de la muestra eluída en un gel de agarosa al 3% por no mas de 15 min para verificar la banda correspondiente a los RNAs pequeños. La cuantificación se realizó mediante el registro de los pixeles obtenidos en cada banda con la ayuda del fotodocumentador "Versadoc Imaging System" (BioRad).

Cuantificación del miRNA 222 por RT-PCR en Tiempo Real.

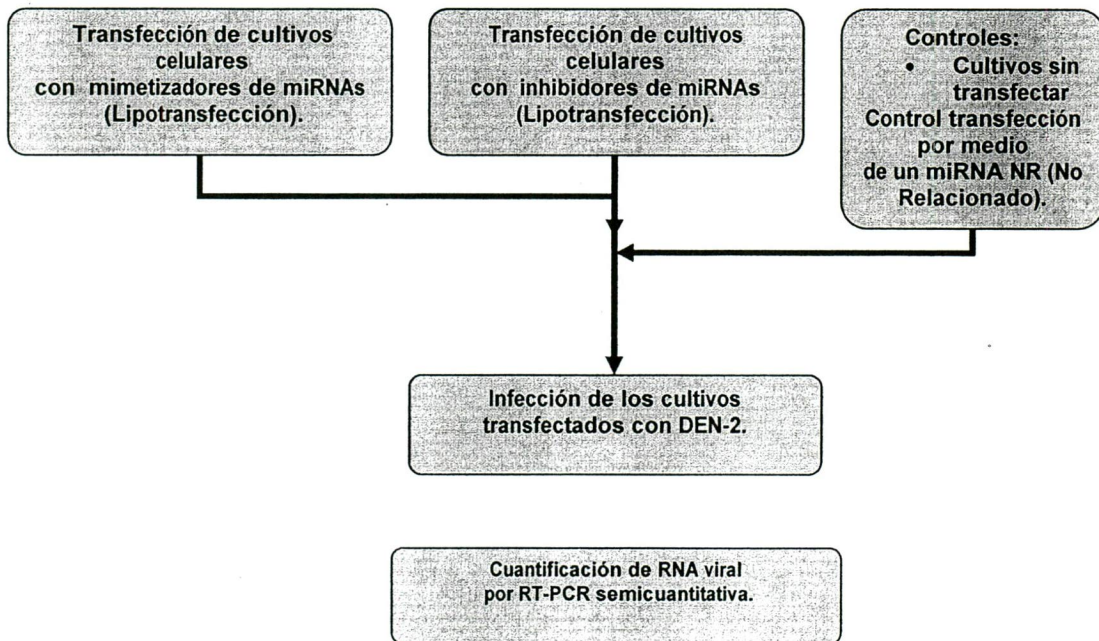
Después de la extracción de los miRNAs en cada uno de los cultivos en las diferentes condiciones, se lleva a cabo la cuantificación de los miRNAs de interés por RT-PCR Tiempo Real.

La cuantificación de los miRNAs se realizó con “mirVana qRT-PCR miRNA Detection Kit” (Ambion), utilizado para la transcripción reversa y PCR cuantitativa que permite la detección de la expresión de los miRNAs a partir de los miRNAs purificados. Como control positivo de amplificación en los ensayos de transcripción reversa y PCR se utilizó un miRNA ubicuo miRNA-24 que se encuentra en un extracto de RNA de corazón (incluido en el kit). Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, se mezclaron 20ng de la solución miRNAs eluidos de cada condición, 2 μ l de Buffer de RT mirVana 5X, 1 μ l del iniciador para RT diseñado específicamente para el miRNA-222, 0.4 μ l de la enzima ArrayScript y agua libre de nucleasa para llevar a 10 μ l. Se incubaron por 30 min a 37°C y posteriormente por 10 min a 95°C para inactivar la enzima de RT.

Los cDNAs obtenidos en la reacción de retrotranscripción se mezclaron con 5 μ l de Buffer de PCR mirVana 5X (contiene dNTPs y Magnesio), 0.5 μ l de iniciadores de PCR mirVana específicos para el miRNA-222, 1.25 μ l de Evagreen 20X (Biotium), 1 U de SuperTaq (Ambion) y agua libre de nucleasa para llevar a 25 μ l. La reacción se realiza en placas de 96 pozos por duplicado para cada una de las condiciones de estudio. Las condiciones de PCR utilizadas son: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 minutos y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 30 segundos. La cantidad de miRNAs expresados en cada una de las condiciones se determinó mediante el método de C_T (Cycle Threshold), ya que este es un parámetro que se toma como medida indirecta de la cantidad de templado que se encuentra inicialmente en cada reacción. Siendo una C_T menor, indicativo de que hay mas templado en comparación con una C_T mayor y viceversa.

Determinación del efecto de los mimetizadores e inhibidores de los miRNAs en la replicación de DEN-2.

Con el fin de determinar el efecto del miRNA 222 en la replicación de DEN-2, se transfectan los cultivos celulares con mimetizadores e inhibidores de dicho miRNA, para esto se llevó a cabo el diagrama de flujo que se muestra a continuación.



Transfección de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 en los cultivos primarios de macrófagos humanos.

La transfección de los cultivos celulares con mimetizadores e inhibidores del miRNA 222 se realizó por el método de lipotransfección con el reactivo siPORT Amine (Ambion). Las células utilizadas para este propósito se mantuvieron en ausencia de antibióticos al menos 24h antes de la transfección. La mezcla de transfección se realizó de la siguiente manera: 3 μ l de siPort se incubaron por 5min a temperatura ambiente y posteriormente se mezclaron con 15 y 20 nM de los inhibidores o mimetizadores del miRNA específico (Ambion) o 20 nM del miRNA NR (sin blanco en células de mamífero) y medio de cultivo para ajustar a 250 μ l. Después de 15 min de incubación se agregó la mezcla de transfección con 250 μ l de medio de cultivo sin antibióticos a la monocapa de

células. Los cultivos primarios de macrófagos fueron transfectados durante 12 h para posteriormente llevar a cabo la infección por 36 h con DEN-2. Las células se trataron con el método de trizol para la extracción del RNA total y de este se trataron 500 ng con DNAsa para la reacción de RT-PCR en donde se llevó a cabo la detección del genoma viral y de ciclofilina como control de carga mediante RT-PCR semicuantitativa.

Extracción de RNA total de los cultivos celulares.

Se retira el medio de cultivo de la placa que contiene la monocapa de células y se adiciona 1ml de TRizol por cada 35mm de diámetro de la placa o 0.5 ml por pozo para placas de 12 pozos, se homogeniza con pipeteo y se deja interaccionar por 5 min, posteriormente se añaden 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRizol, se mezcla y se incuba por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar las muestras a 12,000g por 15 minutos se toma la fase acuosa y se mezcla con 0.5ml de isopropanol por cada ml de TRizol usado en la homogenización inicial. Esta mezcla se incuba por 10 min y se centrifuga a 12,000g por 10 minutos a 4°C. La pastilla obtenida se lava con 1ml de etanol al 75% y se centrifuga a 7,500g por 5 minutos de 4°C. Después de dejar secar la pastilla que contiene al RNA se resuspende en agua libre de nucleasas y se almacena a -70°C hasta su uso.

Cuantificación de RNA viral por RT-PCR.

Los iniciadores a utilizar para esta técnica amplifican una región de la proteína no estructural NS5 del genoma del virus del dengue dando así un producto final de aproximadamente 265pb y su secuencia es la siguiente:

	Secuencia	Posición en el genoma.
Primer Sentido	5'-TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAA-3'	8993
Primer Antisentido	5'-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3'	9258

Como control de carga se analizó la expresión de ciclofilina para lo cual se obtiene un producto de amplificación de 105pb utilizando los iniciadores cuya secuencia se muestra en siguiente la tabla:

Primer Sentido	5'-TTTCATCTGCACTGCCAAGACT-3'
Primer Anti-sentido	5'- CCATTCCTGGACCCAAAGC- 3'

La reacción de retrotranscripción se realizó con la enzima Improm II (Promega) de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante. Brevemente, se mezclaron 500 ng de RNA total con 200 nM del iniciador antisentido específico y agua libre de nucleasa para completar 5 μ l, se incubaron a 70°C por 5min, posteriormente se pasaron a hielo por 3min para después añadir 4 μ l Buffer RT Improm II 5X, 1 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, 2.4 μ l de MgCl₂ 3mM, 1 μ l de enzima RT Improm II y agua libre de nucleasa para llevar a 20 μ l. Se incubó por 60 min a 37°C y posteriormente a 70°C por 15 min. El producto obtenido se almacena a -20°C o se usa inmediatamente en la reacción de PCR.

La reacción de PCR se realizó a partir de 5 μ l del cDNA obtenido en la reacción anterior y se mezcló con 2.5 μ l Buffer de PCR 10X. 0.5 μ l de la mezcla de dNTPs 10mM, 0.75 μ l MgCl₂ 50mM, 200 nM del iniciador sentido y antisentido, 1.25 μ l de Eva Green 20X [(Biotium), sólo para el caso de la cuantificación en tiempo real], 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y agua ultrapura para completar 25 μ l. Los ciclos de PCR se realizaron como sigue: 1 ciclo de 95°C 5 min, 40 ciclos de 95°C 20 s, 60°C 30 s (para DEN-2) ó 55°C (para ciclofilina), 72°C 30 s, seguido de una etapa de disociación diseñada de manera estándar por el equipo de tiempo real.

RESULTADOS

Predicción de los miRNAs del huésped que interactúan con la región DB1 de la UTR 3' del genoma de DEN-2.

La base de datos Vita actualmente disponible en el sitio: <http://vita.mbc.nclu.edu.tw/>. fué creada para facilitar la investigación de las funciones de los miRNAs de humano, ratón, rata y pollo en la infección viral; en esta base de datos se encuentra la secuencia de los miRNAs descritos de las especies mencionadas y los blancos predichos en el RNA de los diferentes virus.

Como se ha mencionado anteriormente, el principal blanco de los miRNAs descritos a la fecha es la UTR 3' de los RNAm, por lo que nos enfocaremos a la predicción de blancos de los miRNAs de humanos para los que prediga una interacción en esta región en el genoma de diversas cepas de DEN-2.

Debido a la variación en el tamaño de los genomas del virus del dengue, se analizaron los miRNAs que se predice interactúan a partir del nucleótido 10,100 hasta finalizar el genoma en el extremo 3' con la finalidad de cubrir la totalidad de la UTR 3' de las diferentes cepas de DEN-2. Cabe destacar que solo se tomaron los miRNAs que tenían en común al menos 14 de las 15 cepas de DEN-2 analizadas (Tabla 1).

De este análisis resultaron 16 miRNAs (Tabla 2) que flanquean en la región UTR 3' de DEN-2. Cabe destacar que la base de datos ViTa solo arroja los miRNAs termodinámicamente estables para hibridar con su blanco ($\Delta G = -12$).

Cepa	N. de acceso de NCBI.	Cepa	N. de acceso de NCBI.
New Guinea C/PUO-218	AF038402	98900666 DSS	AB189124
K0008	AF100459	ThNH-7/93	AF022434
C0371	AF100461	Mara4	AF100466
Ven2	AF100465	IQT1797	AF100467
BR64022	AF489932	131	AF100469
DR23/01	AB122020	China isolate 04	AF119661
ThNH29/93	AF169678	ThNH36/93	AF169679

Tabla 1. Cepas de DEN-2 incluidas en el análisis de hibridación con miRNAs de humanos realizado mediante ViTa

miRNA	Número de cepas de DEN-2.	miRNA	Número de cepas de DEN-2.
184	14	9	15
338	14	199a	15
378	14	199b	15
451	14	210	15
510	14	222	15
525	14	296	15
542-5p	14	378	15
Let 7i	15	507	15

Tabla 2. miRNAs que interaccionan con la UTR 3' en al menos 14 de las 15 cepas analizadas.

Entre los miRNAs que interaccionan con la UTR 3' se seleccionaron los que se predice se unen a las regiones de importancia en la viabilidad viral en las 15 cepas de DEN-2 analizadas, como lo son la CS 3' que hibrida con el miRNA 199b y 338 o con la región DB1 que hibrida con los miRNAs 210, 222 y 525.

Para este estudio se seleccionó la región DB1, la cual tiene un papel importante en la regulación de la viabilidad viral ya que en estudios previos se determinó que su eliminación resulta en inhibición de la viabilidad viral (28). En el presente trabajo nos enfocaremos en el papel del miRNA-222 que se predice interacciona con la región DB1 ($\Delta G = -24$) así como la función que éste podrían llevar a cabo en el ciclo replicativo el virus del DEN-2 (Figura 4).

Detección del miRNA-222 en cultivos primarios de macrófagos y de células dendríticas humanas no infectadas e infectadas con DEN-2.

Para determinar el papel del miRNA-222 en el ciclo replicativo del virus del dengue se realizaron dos estrategias, la primera fué determinar su expresión en cultivos primarios de macrófagos humanos no infectados e infectados con DEN-2 y la segunda fue determinar el efecto que causan los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 en la eficiencia de replicación viral en dichas células.

Los macrófagos humanos se han identificado como uno de los blancos más importantes en la infección por el virus del dengue por lo que se eligió como modelo para este proyecto de tesis. Los cultivos primarios se infectaron a una moi de 10 para determinar si existe una modulación en la expresión del miRNA-222 en las primeras horas de infección: 12, 24 y 36 h. La moi que se eligió para infectar el cultivo ha demostrado ser adecuada para su detección en el cultivo a partir de 12h por ensayos de plaqueo, esto se ha determinado por experimentos realizados previamente en nuestro grupo de trabajo.

El RNA total y los miRNAs expresados en los cultivos primarios de macrófagos humanos infectados a los diferentes tiempos se purificaron, se cuantificaron por espectrometría y se separaron en geles de poliacrilamida o agarosa para verificar su integridad. Primeramente se realizó RT-PCR en punto final para detectar el RNA viral, así se corroboró que las células estuvieran realmente infectadas en los diferentes tiempos a analizar (Figura 5). Como se puede observar en todos los tiempos probados se obtuvo una banda del tamaño esperado que indica la amplificación del RNA viral, con lo que se concluye que las células se encontraban infectadas a las 12, 24 y 36h.

El nivel de infección de los cultivos primarios en las distintas condiciones también se determinó por RT-PCR en tiempo real, utilizando como control de carga el amplicón del RNAm de ciclofilina, que es un gen de expresión constitutiva. La cuantificación del RNA viral se llevó a cabo mediante el método de cuantificación relativa en donde se toma en cuenta el valor de Ct obtenido durante el proceso de tiempo real, el cual es un valor que refleja de manera inversa la cantidad de templado inicial en la reacción de PCR en tiempo real, es

decir que entre más bajo sea el valor de Ct mayor será la cantidad de templado inicial en la muestra problema y viceversa.

Se pudo determinar que los cultivos primarios de macrófagos analizados se encontraban infectados con DEN-2, observando una mayor intensidad de la fluorescencia del amplicón de DEN-2 se incrementaba conforme los tiempos de infección son mayores. En punto final se obtiene un producto esperado de 265pb en las células infectadas (Figura 5). Como control positivo de infección se realizó un cultivo de células dendríticas las cuales tiene una alta susceptibilidad a la infección por DEN-2.

Al realizar la RT-PCR en tiempo real se obtuvieron los valores de Ct en cada uno de los tiempos de infección (Figura 6a) a las 12h postinfección el Ct fue de 27.16, a las 24h de 26.58 y a las 36h de 26.22. La Tm (temperatura de fusión) en el paso de disociación fue de 86.7°C en promedio lo que confirma la amplificación de un producto específico durante la reacción, debido a que la Tm está dada de acuerdo al % de GC presente en el amplicon (Figura 6b). Los resultados obtenidos indican que el cultivo primario se encuentra infectado y que el nivel de infección aumenta conforme al tiempo de infección.

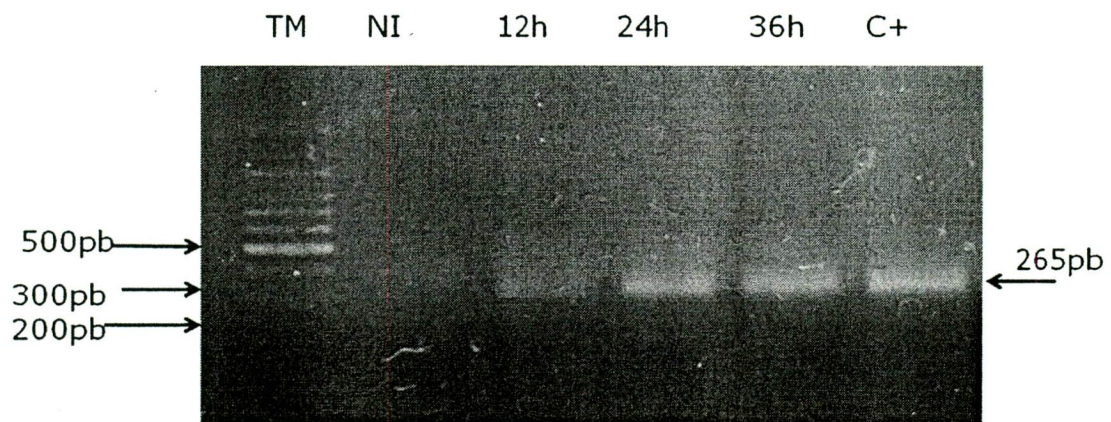
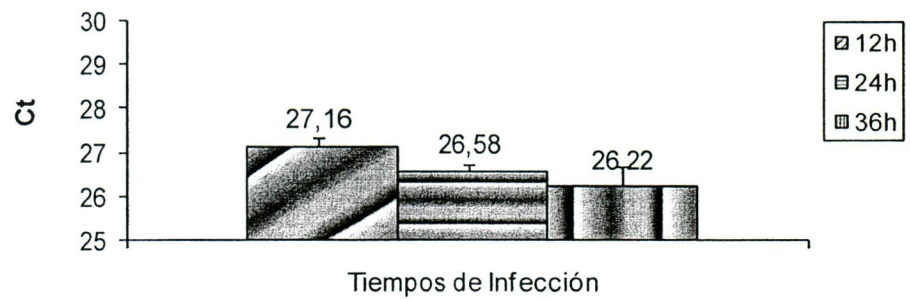


Figura 5. Detección del RNA de DEN-2 en el cultivo primario de macrófagos humanos mediante PCR en punto final. Los cultivos primarios de macrófagos humanos se incubaron en ausencia (NI) o en presencia del virus DEN-2 a una moi de 10, posteriormente se aisló el RNA total de dichas células a las 12 (12h), 24 (24h) y 36 (36h) horas posinfección. A partir del RNA total se realizó la RT-PCR en punto final en la que se espera un amplicón de 265pb. Como control positivo de infección (C+) se utilizó el RNA de un cultivo de células dendríticas a las 24h postinfección a una moi de 10. El marcador de tamaño molecular (MTM) es 100 pb ladder (Invitrogen)

a)

DEN-2 EN MACROFAGOS INFECTADOS MOI:10



b)

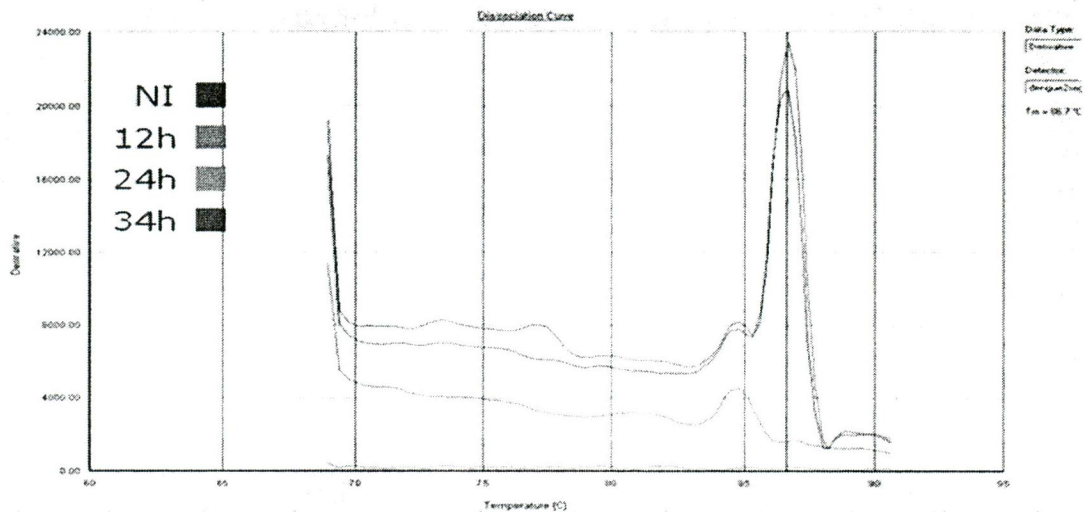


Figura 6. Nivel de expresión del RNA viral en cultivo primario de macrófagos humanos. a) Los cultivos primarios de macrófagos humanos se incubaron en ausencia (NI) o en presencia del virus DEN-2 a una moi de 10, posteriormente se aisló el RNA total de dichas células a las 12 (12h), 24 (24h) y 36 (36h) horas posinfección. En el eje X se graficaron los tiempos de infección y en el eje Y el valor de Ct. b) Curva de Disociación del amplicón de DEN-2 en macrófagos obtenidos por cultivo primario infectado. En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

Los datos obtenidos en la cuantificación del RNA viral reflejan la eficiencia de replicación del virus a los distintos tiempos, ya que los niveles del control de carga fueron similares en todas las condiciones (Figura 7).

a)



b)

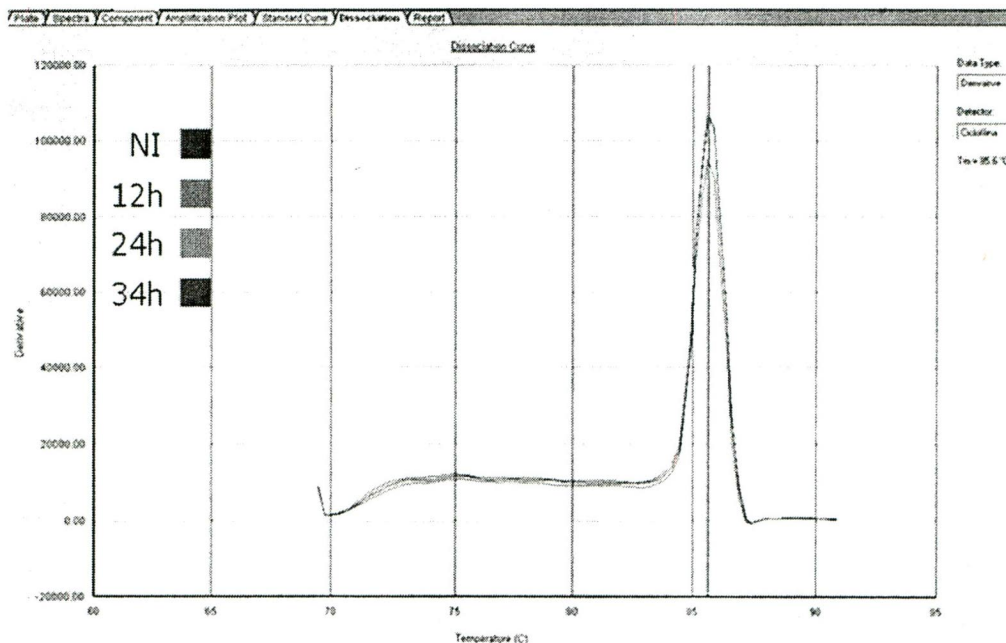


Figura 7. Nivel de expresión del control de carga ciclofilina en cultivo primario de macrófagos humanos. a) Los cultivos primarios de macrófagos humanos se incubaron en ausencia (NI) o en presencia del virus DEN-2 a una moi de 10, posteriormente se aisló el RNA total de dichas células a las 12 (12h), 24 (24h) y 36 (36h) horas postinfección. En el eje X se graficaron los tiempos de infección y en el eje Y el valor de Ct. b) Curva de Disociación del amplicon de control de carga ciclofilina en macrófagos obtenidos por cultivo primario infectado con DEN-2. En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

Los experimentos de infección del cultivo primario de macrófagos se llevaron a cabo con un segundo donador y los resultados obtenidos fueron similares en ambos casos.

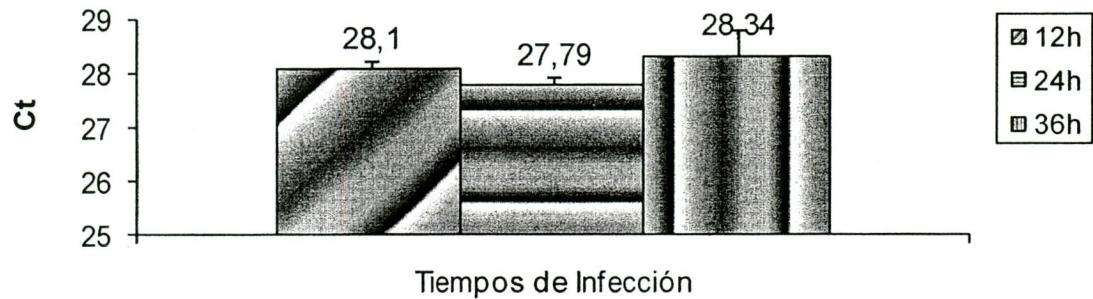
Como se mencionó, las células dendríticas son también un blanco en la infección por dengue en humanos y se infectan con el virus de manera más eficiente que los macrófagos por lo que para asegurarnos que el cultivo estudiado tenía una alta eficiencia de infección se incluyó un cultivo primario de células dendríticas humanas para la comparación de la expresión del miRNA-222 en células no infectadas e infectadas.

Al realizar la RT-PCR en tiempo real para la detección del genoma viral en las células dendríticas infectadas se obtuvieron los siguientes valores de Ct en cada uno de los tiempos de infección (Figura 8a) a las 12h fue 28.1, a las 24h fue 27.79 y a las 36h fue 28.34. Lo anterior refleja que prácticamente el nivel de RNA viral se mantiene en todos los tiempos estudiados conforme transcurre el tiempo de infección. La Tm en el paso de disociación fue de 86.7 °C en promedio lo que coincide con la amplificación del producto específico (Figura 8b).

El nivel de expresión de ciclofilina en las células dendríticas resultó similar en los diferentes tiempos de infección (Figura 9a). En la curva de disociación se obtiene una Tm de 85.6°C en todas las reacciones (Figura 9b). Después de verificar que todos los cultivos a estudiar estuviesen realmente infectados se procedió al análisis de la expresión del miRNA en los cultivos en las distintas condiciones.

a)

DEN-2 EN DENDRITICAS INFECTADAS MOI:10



b)

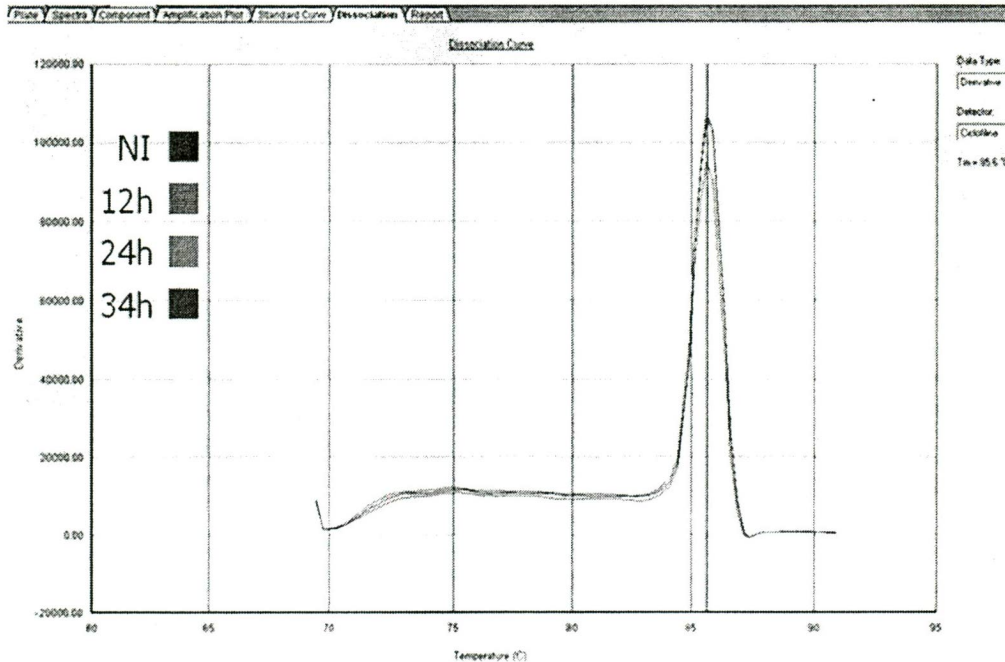


Figura 8. Nivel de expresión del RNA viral en cultivo primario de células dendríticas humanas. a) Los cultivos primarios de células dendríticas humanas se incubaron en ausencia (NI) o en presencia del virus DEN-2 a una moi de 10, posteriormente se aisló el RNA total de dichas células a las 12 (12h), 24 (24h) y 36 (36h) horas postinfección. En el eje X se graficó la Ct a la que se inicia la detección del RNA viral mediante RT-PCR en tiempo real. b) Curva de Disociación del amplicón de control de carga ciclofilina en dendríticas obtenidas por cultivo primario infectado con DEN-2. En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

a)



b)

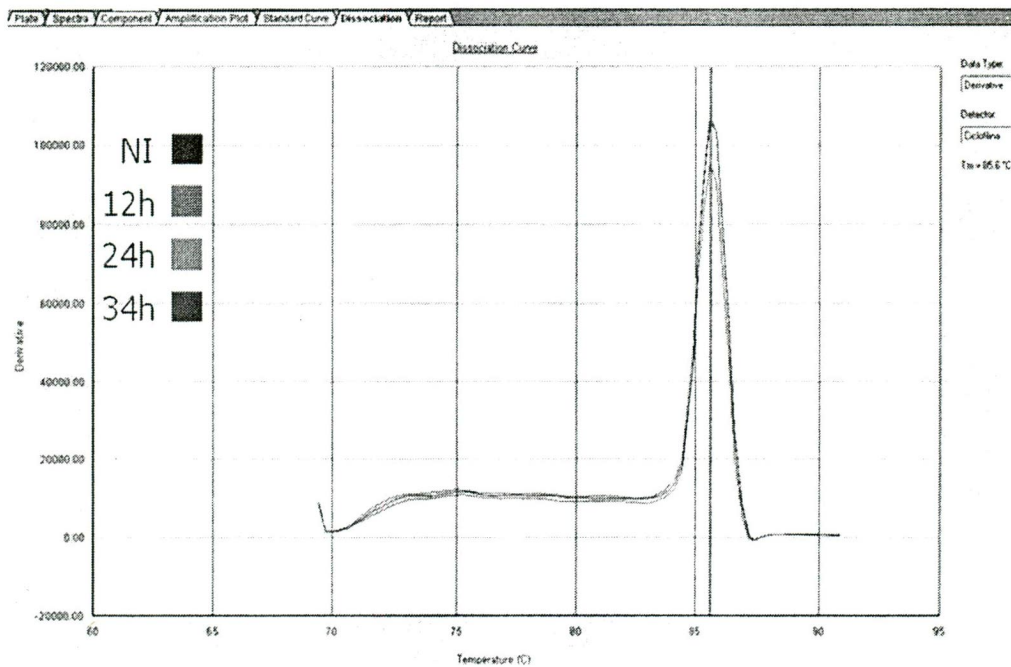


Figura 9. Nivel de expresión del control de carga ciclofilina en cultivo primario de células dendríticas humanas. a) Los cultivos primarios de células dendríticas humanas se incubaron en ausencia (NI) o en presencia del virus DEN-2 a una moi de 10, posteriormente se aisló el RNA total de dichas células a las 12 (12h), 24 (24h) y 36 (36h) horas postinfección. En el eje X se graficó la Ct a la que se inicia la detección del RNA viral mediante RT-PCR en tiempo real. b) Curva de Disociación del amplicón de control de carga ciclofilina en dendríticas obtenidas por cultivo primario infectado con DEN-2. En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

Comparación del nivel de expresión del miRNA-155 en células no infectadas e infectadas con DEN-2.

Debido a la poca estabilidad y a la cantidad de los miRNAs extraídos, se optó por verificar la integridad y la concentración de la fracción enriquecida con RNA pequeños (menos de 200pb) en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 15% o en geles de agarosa al 3% (Figura 10).

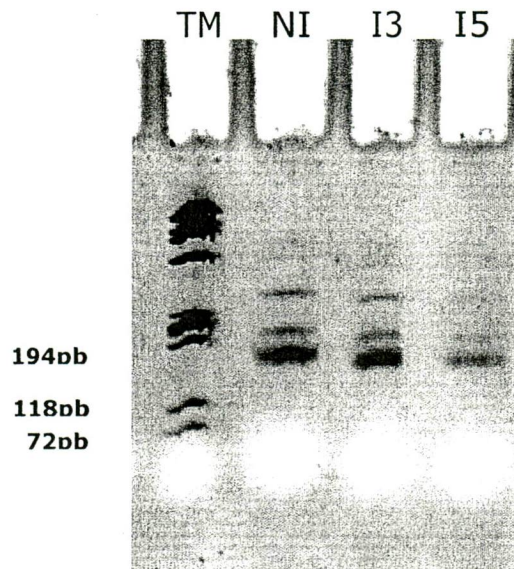


Figura 10. Fracción enriquecida en RNAs pequeños. Los macrófagos humanos se incubaron en ausencia (NI) ó en presencia del virus DEN-2 (cepa 16681) a una moi de 3 (I3) ó 5 (I5) y 24 h postinfección se procesaron para la obtención del miRNA con el método mirVANA. El marcador de tamaño molecular (TM) utilizado fue DNA molecular Weight Marker IX (Roche). Los RNAs se separaron en gel de poliacrilamida al 15% urea 8M.

La cuantificación relativa de la expresión de los miRNAs de interés se realizó mediante RT-PCR en tiempo real tomando en cuenta el valor de Ct obtenido durante el proceso de tiempo real, siendo éste un valor que refleja de manera inversa la cantidad de templado inicial en la reacción de PCR.

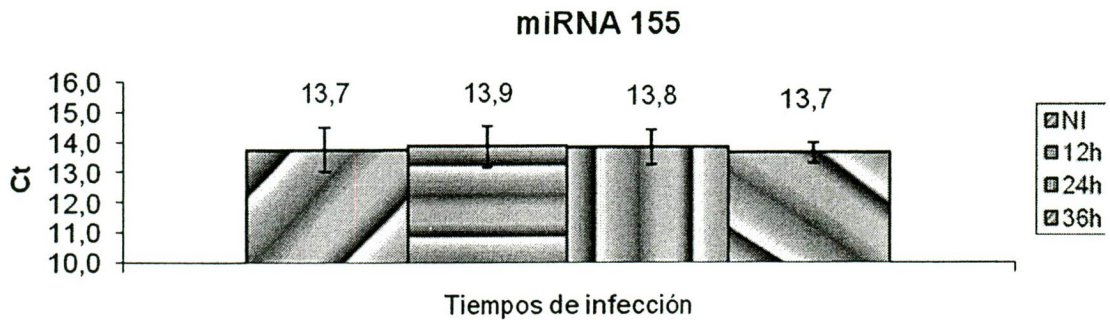
Para asegurarnos que el protocolo de extracción, purificación y detección era eficiente para la amplificación de un miRNA que debía resultar positivo en nuestro sistema se decidió determinar la expresión del miRNA-155, el cual se ha reportado previamente que incrementa su expresión en la respuesta inflamatoria a RNAs sintéticos de doble cadena (43).

En el análisis del nivel de expresión del miRNA-155 en macrófagos humanos con el estímulo de la infección con dengue los valores de Ct obtenidos fueron los siguientes, en células no infectadas la Ct obtenida fue 14.275 y a las 12h postinfección fue 14.36, a las 24h fue 14.245 y a las 36 fue 13.885 (Figura 11a). La Tm en el paso de disociación fue de 81.5°C en promedio (Figura 11b).

Como se puede apreciar aunque se detectó la expresión del miRNA-155 en todas las condiciones, no se observó ningún cambio después de la infección viral, por lo que se especula que esto se debió a las diferencias del modelo utilizado en nuestro estudio con respecto a lo reportado previamente.

La detección del miRNA-155 se llevó a cabo también en el cultivo primario de células dendríticas en las cuales tampoco se observaron cambios entre el nivel de expresión de dicho miRNA entre las células no infectadas y las infectadas, ya que todas las Ct estuvieron entre 13.67 y 13.77 (Figura 12). De esta manera se pudo corroborar el resultado obtenido con el cultivo de macrófagos.

a)



b)

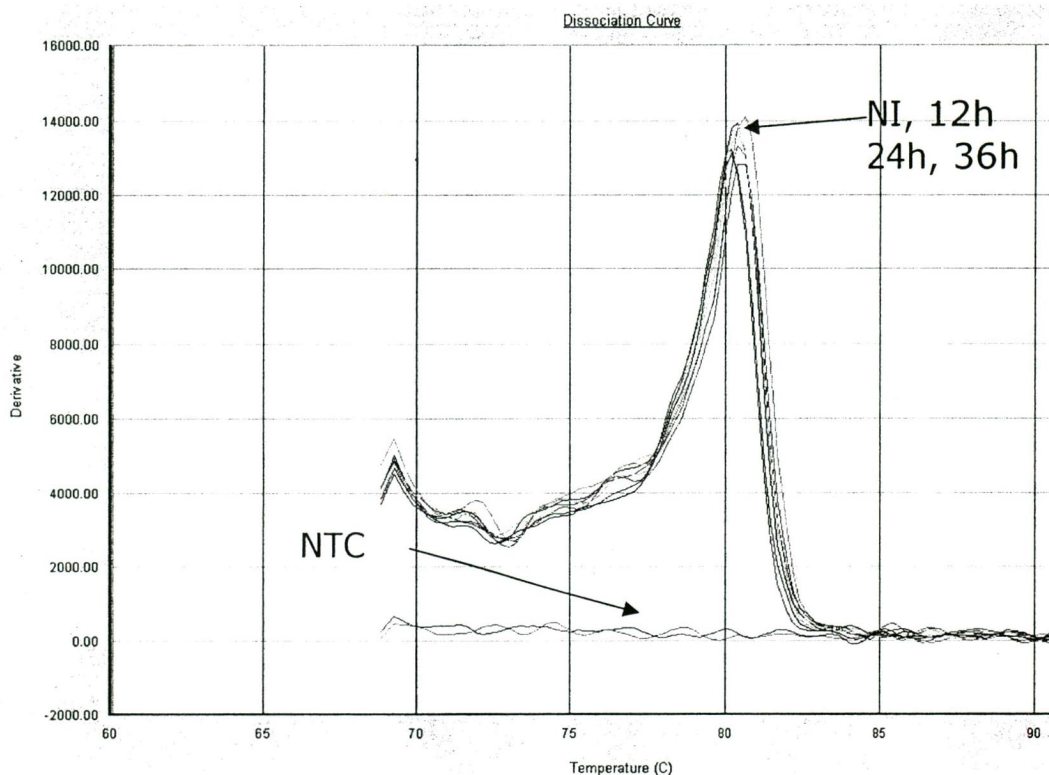


Figura 11. Nivel de expresión del miRNA 155 en cultivo primario de macrófagos humanos. a) Los miRNAs de macrófagos humanos se obtuvieron de células no infectadas (NI) ó infectadas con DEN-2 a una moi de 10 por 12 (12h), 24 (24h) ó 36h (36h) y se utilizaron para realizar RT-PCR en tiempo real para la amplificación del miRNA-155. En el eje X se graficaron los tiempos de infección y en el eje Y el valor de Ct. b) Curva de Disociación del amplicón de control de carga ciclofilina. Se incluyó un control de la reacción de PCR sin templado (NTC). En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

a)



b)

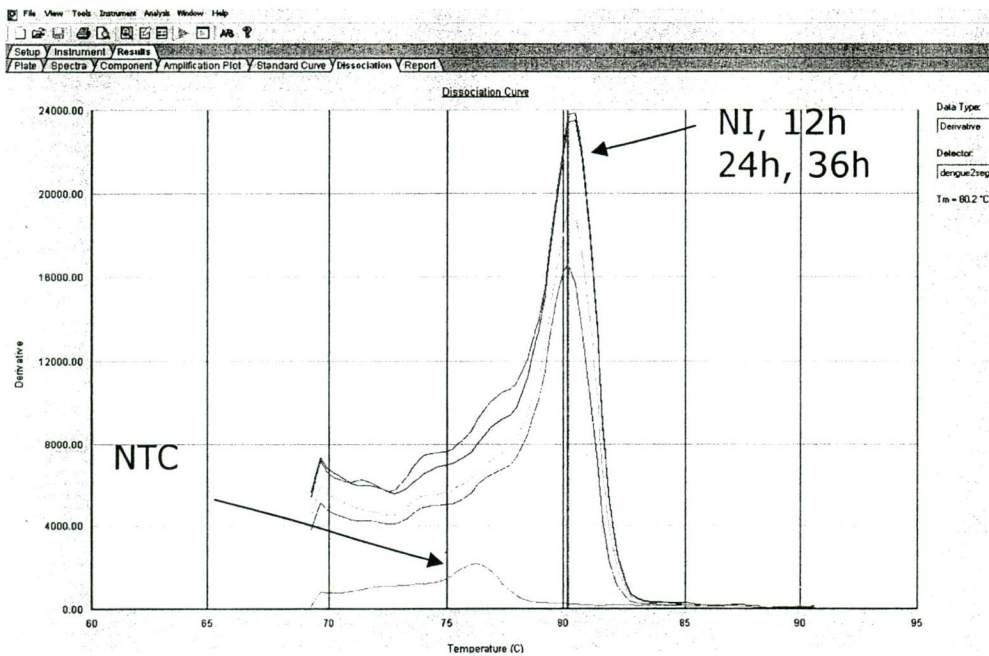


Figura 12. Nivel de expresión del miRNA 155 en cultivo primario de células dendríticas humanas. a) Los miRNAs de células dendríticas humanas se obtuvieron de células no infectadas (NI) ó infectadas con DEN-2 a una moi de 10 por 12 (12h), 24 (24h) ó 36h (36h) y se utilizaron para realizar RT-PCR en tiempo real para la amplificación del miRNA-155. En el eje X se graficó los tiempos de infección y en el eje Y el valor de Ct. b) Curva de Disociación del amplicón de control de carga ciclofilina. Se incluyó un control de la reacción de PCR sin templado (NTC). En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

Comparación del nivel de expresión del miRNA-222 en células no infectadas e infectadas con DEN-2

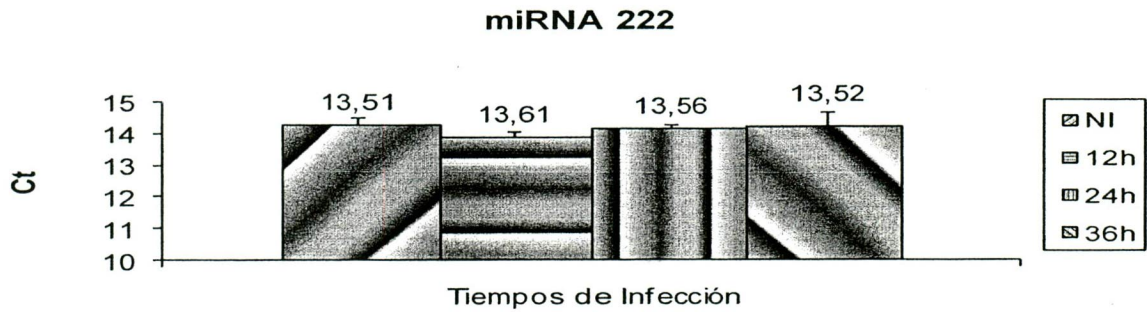
Una vez realizada la detección del control de expresión de los miRNAs, se determinó la expresión del miRNA-222 en macrófagos humanos infectados en las condiciones descritas anteriormente. Al realizar la RT-PCR en tiempo real se obtuvieron los siguientes valores de Ct en células no infectadas fue de 14.31 y después de 12, 24 y 36h de infección las Cts fueron 13.92, 14.19 y 14.27 respectivamente (Figura 13a) siendo la Tm en el paso de disociación de 81.3°C en congruencia con lo esperado para dicho producto de amplificación (Figura 13b). Cabe mencionar que el experimento se realizó por duplicado presentando el mismo patrón de comportamiento para dichos miRNAs en ambos experimentos.

El nivel de expresión del miRNA-222 se determinó también en el cultivo de células dendríticas no infectadas e infectadas; con la finalidad de comparar los resultados con los obtenidos con el cultivo primario de macrófagos, que como se ha mencionado son más susceptibles a la infección por dengue, y probablemente por ello se pudiera encontrar inducción de la expresión del miRNA-222.

Al realizar la infección de células dendríticas, no se encontraron diferencias en la expresión del miRNA-222 a las 12,24 y 36h postinfección (Ct de 13.98, 13.88 y 13.79 respectivamente) con respecto al control (Ct de 13.83) (Figura 14a), siendo la Tm en el paso de disociación es de 81.7 °C en congruencia con los esperado para producto de PCR esperado (Figura 14b).

Como se pudo apreciar no existen diferencias en el nivel de expresión del miRNA-222 entre las condiciones estudiadas, por lo que se sugiere que en nuestro modelo de infección por el virus DEN-2 no induce la expresión del miRNA-222.

a)



b)

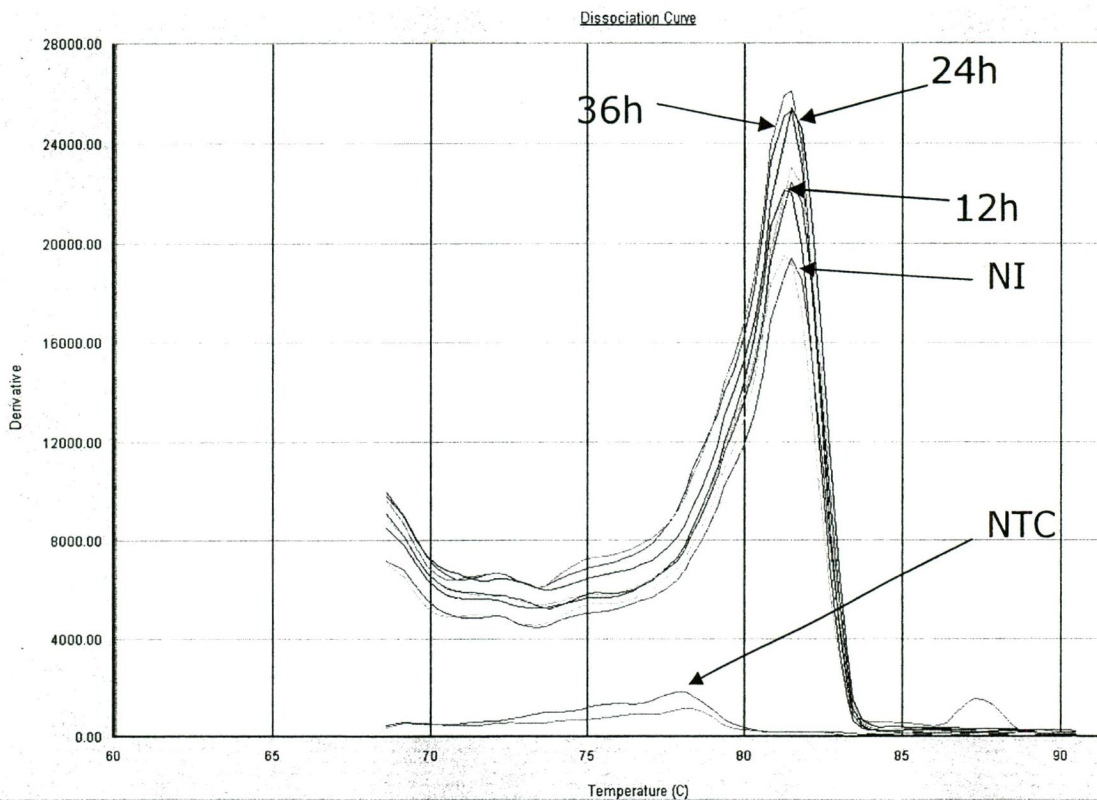


Figura 13. Nivel de expresión del miRNA-222 en cultivo primario de macrófagos humanos. a) Los miRNAs de macrófagos humanos se obtuvieron de células no infectadas (NI) ó infectadas con DEN-2 a una moi de 10 por 12 (12h), 24 (24h) ó 36h (36h) y se utilizaron para realizar RT-PCR en tiempo real para la amplificación del miRNA-222. En el eje X se graficó la Ct a la que se inicia la detección del miRNA-222 viral mediante RT-PCR en tiempo real. En la tabla se muestran los promedios de los valores de Ct promedio del experimento realizado por duplicado. B. Curvas de disociación de los productos obtenidos en la reacción de PCR en tiempo real. Se incluyó un control de la reacción de PCR sin templado (NTC). En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

a)



b)

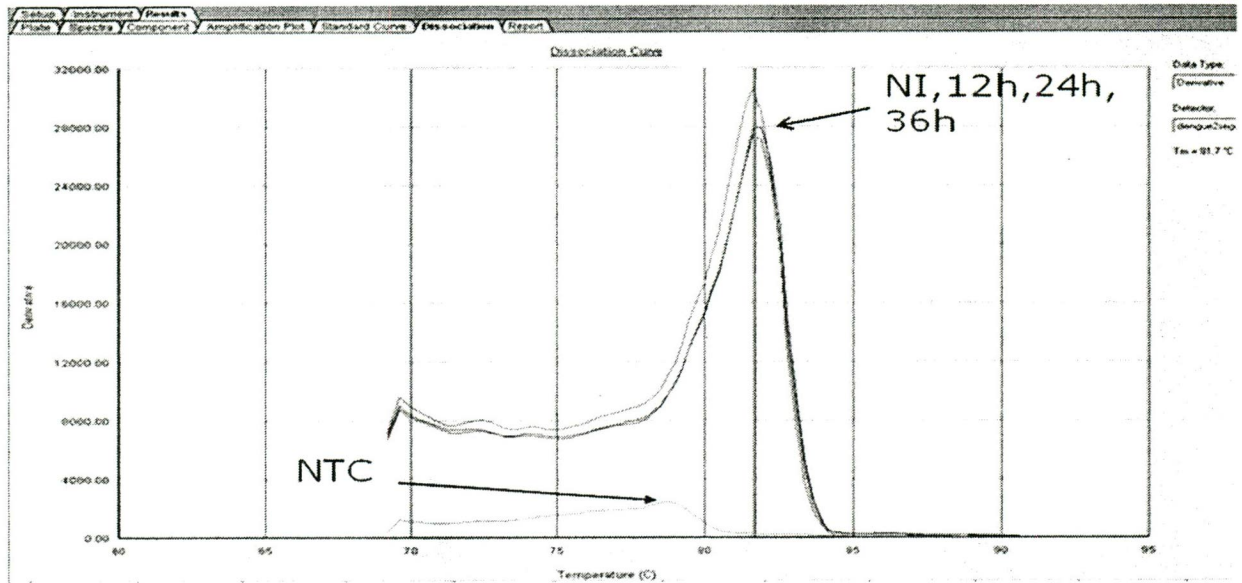


Figura 14. Nivel de expresión del miRNA 222 en cultivo primario de células dendríticas humanas. a) Los miRNAs de células dendríticas humanas se obtuvieron de células no infectadas (NI) ó infectadas con DEN-2 a una moi de 10 por 12 (12h), 24 (24h) ó 36h (36h) y se utilizaron para realizar RT-PCR en tiempo real para la amplificación del miRNA-222. En el eje X se graficó la Ct a la que se inicia la detección del miRNA-222 mediante RT-PCR en tiempo real. En la tabla se muestran los promedios de los valores de Ct promedio del experimento realizado por duplicado. B. Curvas de disociación de los productos obtenidos en la reacción de PCR en tiempo real. Se incluyó un control de la reacción de PCR sin templado (NTC). En el eje X se graficó la temperatura de disociación y en el eje Y la derivada dada por condiciones estándar de lectura.

Determinación del efecto de los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 en la replicación de DEN-2.

A pesar de que los resultados obtenidos nos indican que en las condiciones estudiadas la infección viral no induce la modulación de la expresión del miRNA-222 en los cultivos primarios de macrófagos humanos y de células dendríticas se decidió realizar un acercamiento para conocer la función que dicho miRNA pudiera estar llevando a cabo en la replicación del virus del dengue. La estrategia que se realizó para alcanzar tal objetivo fue utilizar mimetizadores e inhibidores de la función del miRNA-222, los cuales se transfectaron en las células en estudio para posteriormente infectarlos con el virus del dengue y determinar la eficiencia de replicación viral.

La estandarización de las condiciones de transfección del cultivo primario de los macrófagos humanos se realizó la transfección de un Pre-miRNA no relacionado (que no presenta ningún RNAm blanco en humano) el cual está marcado con el fluoroforo Cy3. El marcaje del miRNA permitió visualizarlo mediante microscopia confocal y así determinar la eficiencia de transfección.

Después de evaluar diferentes protocolos de transfección las condiciones óptimas en nuestro sistema resultó a partir de 10nM de miRNA, siendo las óptimas 15 y 20 nM, utilizando el reactivo siPortAmine (Ambion) entre otros parámetros establecidos (Figura 15). Cabe mencionar que con el método utilizado se tiene una eficiencia de transfección y sobrevivencia de las células mayor al 90%.

Después de analizar los resultados de la estandarización de la transfección en el cultivo primario se decidió llevar a cabo la transfección de los inhibidores y de los mimetizadores del miRNA-222 a una concentración de 15 y 20nM y determinar su efecto en la eficiencia de replicación viral después de 36h de infección con el virus DEN-2.

Es importante recalcar que no se llevó a cabo una cinética de infección incluyendo los tiempos de 12 y 24h postinfección pues la cantidad de células obtenidas por el método utilizado solo nos permite realizar la transfección de mimetizadores e inhibidores con el mismo donador a las 36h.

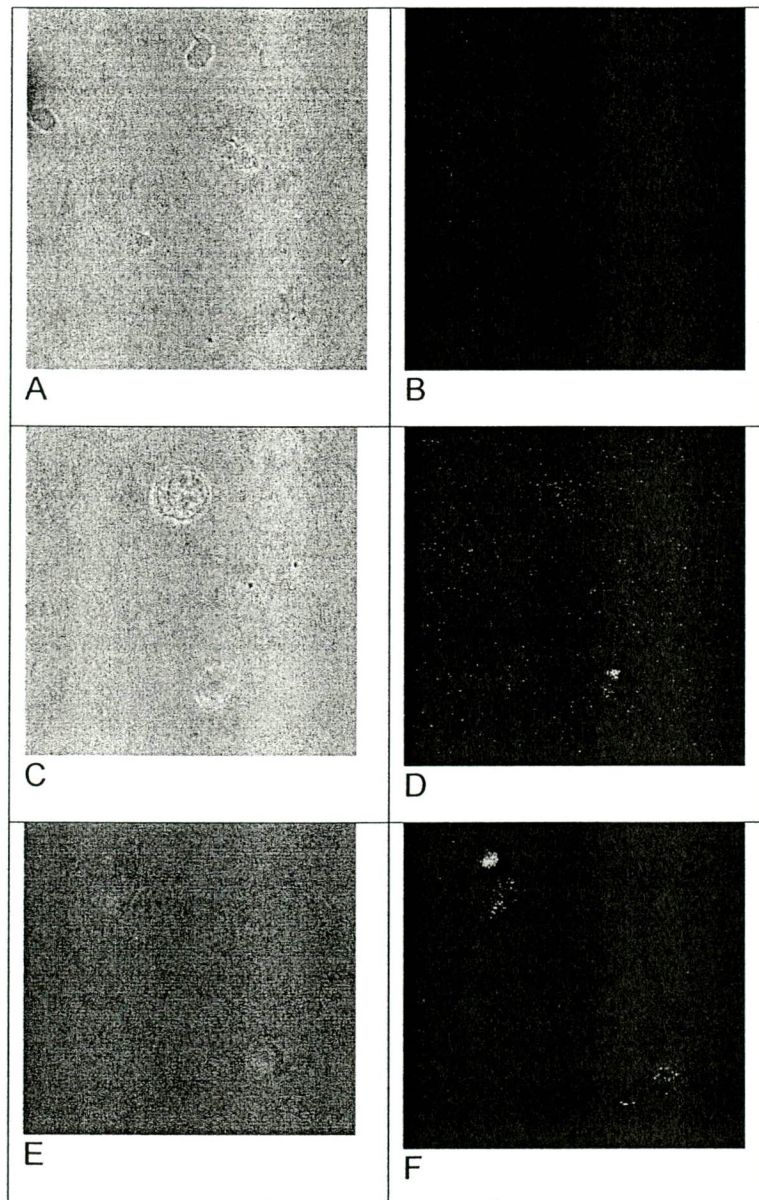


Figura 15. Cultivo primario de macrófagos transfectados con el Pre-miRNA-Cy3. El cultivo primario de macrófagos humanos se trató con siPort en ausencia (B) o en presencia 5 (D), 10 (F), 15 (H) o 20 nM (J) del Pre-miRNA-CY3. Después de 24h de transfección las células se fijaron y se observaron al microscopio confocal Leica TCS SP2. En la columna de la izquierda se encuentran las imágenes en campo claro correspondientes.

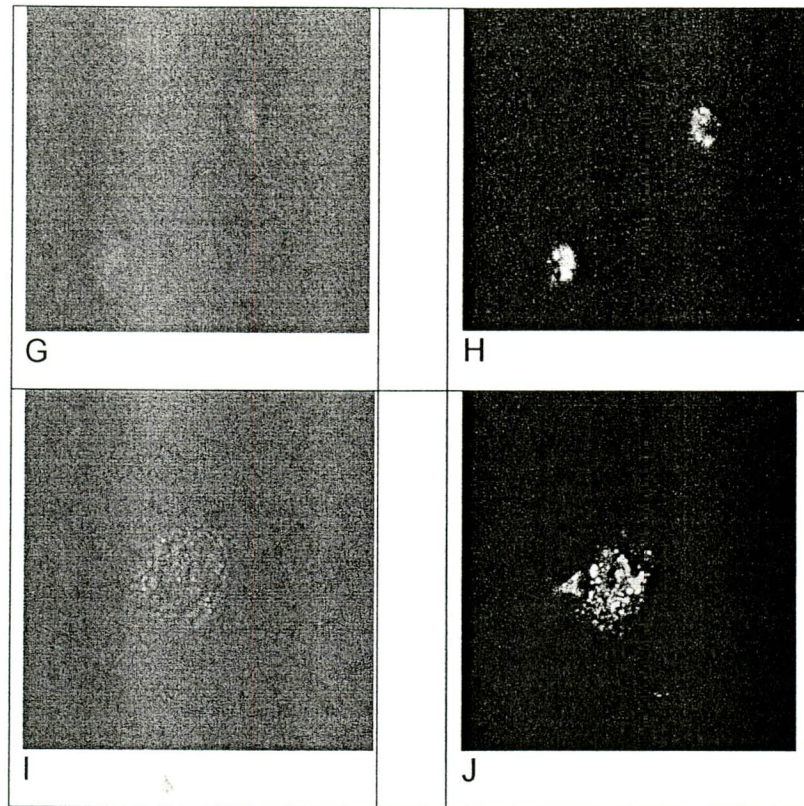


Figura 15 (Continuación). Cultivo primario de macrófagos transfectados con el Pre-miRNA-Cy3. El cultivo primario de macrófagos humanos se trató con siPort en ausencia (B) o en presencia 5 (D), 10 (F), 15 (H) o 20 nM (J) del Pre-miRNA-CY3. Después de 24h de transfección las células se fijaron y se observaron al microscopio confocal Leica TCS SP2. En la columna de la izquierda se encuentran las imágenes en campo claro correspondientes.

La eficiencia de infección se determinó mediante RT-PCR semicuantitativa amplificando el genoma viral con la metodología descrita previamente. Los productos de RT-PCR para la amplificación de ciclofilina como control de carga (Figura 16) y dengue (Figura 17) obtenidos en las diferentes condiciones de transfección se separaron en geles de agarosa y se analizaron por densitometría para normalizar con el control de carga los productos obtenidos de la amplificación del genoma viral.

Después de llevar a cabo la normalización de la carga de los RNAm se determinó el porcentaje de amplificación del genoma viral con respecto al control del experimento, que en este caso son las células tratadas con el miRNA no relacionado, el cual se tomó como 100%. A partir de éste se determinó que la transfección de 15 y 20 nM del mimetizador del miRNA-222 no existen cambios significativos en la eficiencia de replicación viral, sin embargo cuando se trataron con las mismas concentraciones del inhibidor se observó un importante incremento en la eficiencia de replicación viral (Figura 18).

Lo anterior sugiere que el miRNA-222 podría tener un papel inhibitorio de la replicación del virus del dengue en los macrófagos humanos, no obstante se tendrán que llevar a cabo ensayos adicionales para determinar de manera mas fina si el efecto en la replicación es directamente sobre el RNA viral o indirectamente por su efecto sobre algún factor celular que incida en la replicación viral.

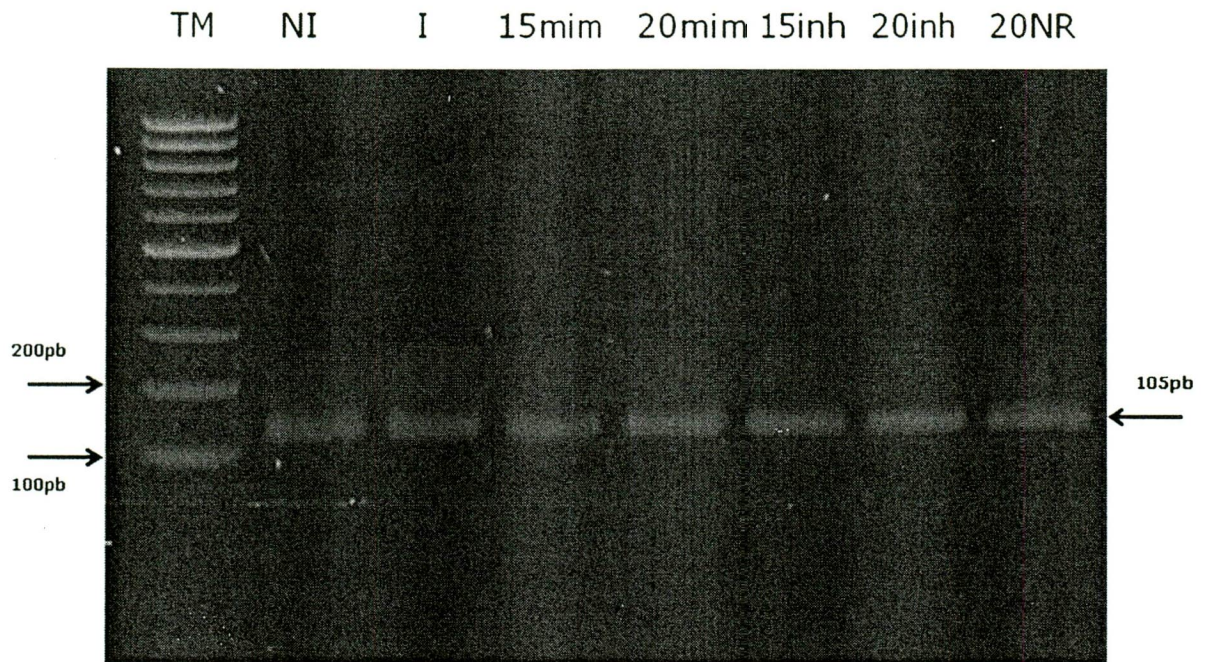


Figura 16. Amplificación de ciclofilina mediante RT-PCR en las células tratadas con los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 e infectadas con DEN-2. El cultivo primario de macrófagos humanos se incubó en ausencia (NI, I) o en presencia de 15 (15mim) o 20nM (20mim) de mimetizadores del miRNA-222, 15 (15inh) o 20nM (20inh) de inhibidores del miRNA-222 o bien 20nM de miRNA no relacionado (20NR) para posteriormente llevar a cabo la infección con el virus DEN-2 a una moi de 10 (I, 15mim, 20mim, 15inh, 20inh y 20NR) por 36h. Después las células se recogieron y se trataron con trizol para la obtención del RNA total y llevar acabo la RT-PCR en donde se utilizaron oligonucleótidos para la amplificación del RNAm de ciclofillina resultando un producto de 105pb el cual se separó en un gel de agarosa al 2%. El marcador de tamaño molecular (TM) utilizado son DNA 100bp Ladder (Fermentas).

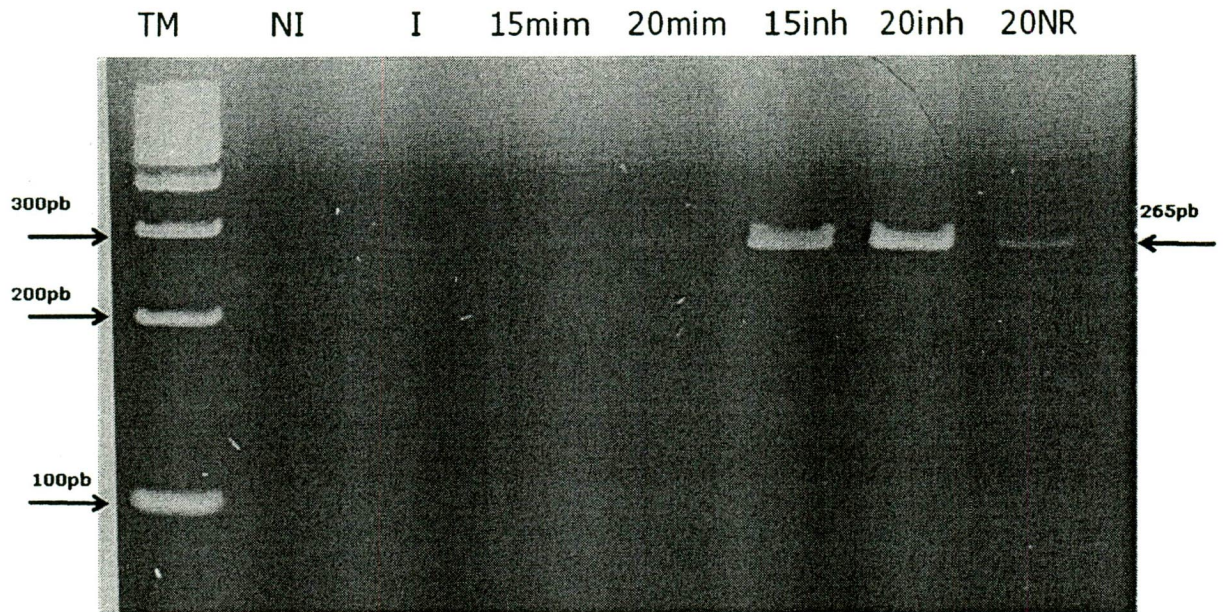


Figura 17. Amplificación del genoma del virus del dengue mediante RT-PCR en las células tratadas con los mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 e infectadas con DEN-2. El cultivo primario de macrófagos humanos se incubó en ausencia (NI, I) o en presencia de 15 (15mim) o 20nM (20mim) de mimetizadores del miRNA-222, 15 (15inh) o 20nM (20inh) de inhibidores del miRNA-222 o bien 20nM de miRNA no relacionado (20NR) para posteriormente llevar a cabo la infección con el virus DEN-2 a una moi de 10 (I, 15mim, 20mim, 15inh, 20inh y 20NR) por 36h. Después las células se recogieron y se trataron con trizol para la obtención del RNA total y llevar acabo la RT-PCR en donde se utilizaron oligonucleótidos para la amplificación de una región del genoma viral de 265pb el cual se separó en un gel de agarosa al 2%. El marcador de tamaño molecular (TM) utilizado son de DNA 100bp Ladder (Fermentas).

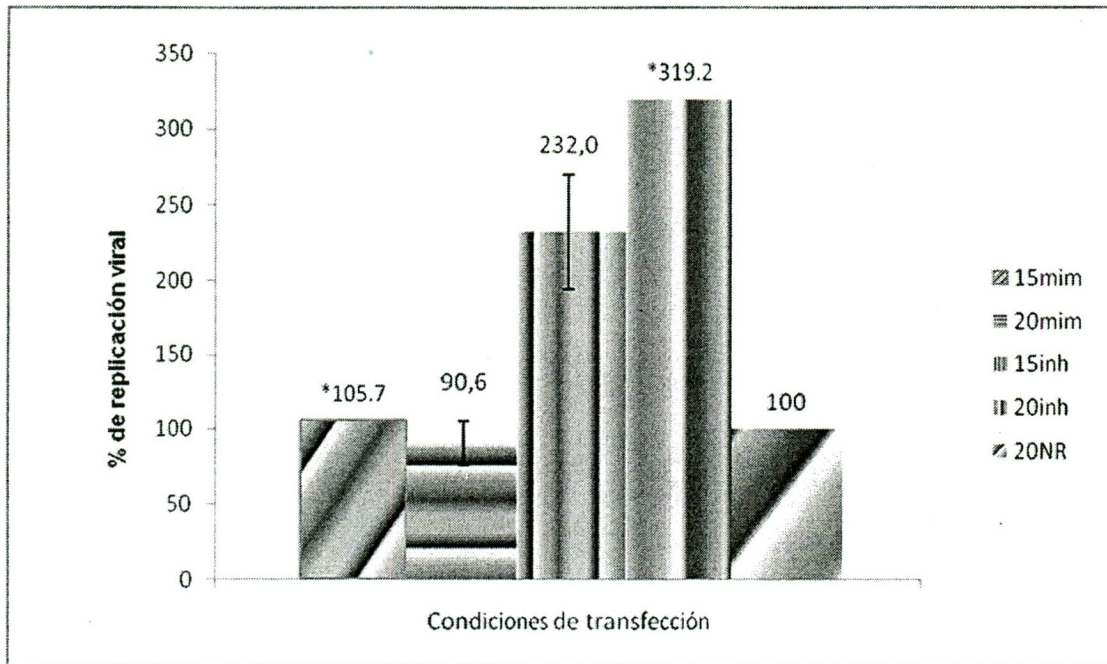


Figura 18. Eficiencia de la replicación viral en cultivo primario de macrófagos humanos tratados con mimetizadores e inhibidores del miRNA-222 e infectados con DEN-2. El cultivo primario de macrófagos humanos se incubó en ausencia (NI, I) o en presencia de 15 (15mim) o 20nM (20mim) de mimetizadores del miRNA-222, 15 (15inh) o 20nM (20inh) de inhibidores del miRNA-222 o bien 20nM de miRNA no relacionado (20NR) para posteriormente llevar a cabo la infección con el virus DEN-2 a una moi de 10 (I, 15mim, 20mim, 15inh, 20inh y 20NR) por 36h. Los porcentajes graficados corresponden a la eficiencia de replicación viral en cada uno de los tratamientos obtenido mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa del genoma del virus del dengue normalizando con la amplificación de ciclofilina como control de carga. Las condiciones correspondientes a las barras con asterisco no pudieron realizarse por duplicado. Las desviaciones estándar de los resultados de cada condición se indican con la barra en las columnas. En el eje Y se graficó % de amplificación del genoma de DEN-2.

DISCUSIÓN

Las infecciones virales traen consigo una gran cantidad de cambios en el medio ambiente celular, entre los que se encuentran la modulación de la expresión genética requerida para llevar a cabo procesos que el virus requiere para su multiplicación además de la activación de vías de respuesta de defensa en contra de la infección. Una de las estrategias de defensa antiviral que recientemente se han descrito en las células infectadas son los miRNAs.

Los miRNA son moléculas de RNA de 19 a 22 nt que regulan más del 90% del transcriptoma humano. Las funciones que los miRNAs realizan se relacionan con procesos como desarrollo, ciclo celular, apoptosis, cáncer, desórdenes neuronales, infecciones, entre otros (35, 37, 38). La regulación postranscripcional que dichos RNAs llevan a cabo se produce por su interacción con las UTRs 3' de los RNAm, produciendo un bloqueo traduccional o la degradación de los mensajeros.

Los miRNAs que se han descrito que participan en las infecciones con virus como el de la hepatitis C, herpes virus, virus de la inmunodeficiencia humana entre otros (39, 41, 42, 43, 44), participan favoreciendo de forma directa o indirecta la replicación viral. Por otro lado, se han descrito miRNAs que participan como un mecanismo de defensa antiviral como el miRNA-155 (43). En el caso del virus del dengue no se había estudiado la participación de los miRNAs en la regulación del ciclo replicativo del virus, por lo que en este trabajo se hicieron predicciones "in silico" de los miRNAs que potencialmente interaccionan con la región UTR 3' del genoma del DEN-2.

Los miRNAs que mediante dicho análisis potencialmente interaccionan con la UTR 3' tienen blancos en regiones de gran importancia para la viabilidad viral, además de contar una ΔG adecuada para que se den las interacciones "in vivo" (menor de -12). Posteriormente se analizó de forma particular el papel que ejerce el miRNA-222 de humano sobre la replicación viral debido a que éste se predijo interacciona con al región DB1 del genoma viral, que se ha señalado como una región importante en la viabilidad viral, ya que su deleción produce virus atenuados (28). Uno de los criterios para seleccionar este miRNA sobre otros candidatos que reconocen la región DB1 fue la predicción de su

interacción con las secuencias de los genomas reportados para 15 cepas de DEN-2.

Para definir la participación del miRNA-222 en la infección por el virus DEN-2, primero se confirmó y cuantificó la presencia este miRNA en cultivos primarios de macrófagos y de células dendríticas humanas, ya que son una de las principales células blanco del virus del dengue en humanos. A pesar que ambos tipos celulares participan de forma imperante en la respuesta inmune ante agentes infecciosos, se han descrito diferencias en la susceptibilidad a la infección por el virus del dengue por lo que también se determinó el grado de infección que presentaban dichos cultivos primarios mediante la detección del genoma viral por RT-PCR en tiempo real, encontrando que ambos se estaban infectados en todos los tiempos probados.

La cinética de la infección muestra que el nivel del virus no incrementa de forma significativa al paso del tiempo, sin embargo es importante considerar que se trata de células del sistema inmune cuya función principal es contrarrestar el proceso infeccioso mediante factores intracelulares y extracelulares.

Uno de los hallazgos importantes de este estudio fue el encontrar que la expresión del miRNA-222 no cambia tras la infección, lo cual nos hace suponer que la expresión basal de dicho miRNA podría ser suficiente para tener un efecto en la replicación viral.

Para confirmar que el sistema de infección estaba funcionando adecuadamente, también se determinó el nivel de expresión basal del miRNA-155 durante la infección viral, cuya función se ha relacionado con la respuesta inmune especialmente inducida por RNA exógenos de doble cadena resultando en la respuesta de interferón (40). Sin embargo en nuestro modelo no se observó una modificación en el nivel de inducción de este miRNA como resultado de la infección.

Otra parte del trabajo consistió en evaluar el efecto de la sobreexpresión y la inhibición de este miRNA durante la infección viral, para lo cual se transfectaron los cultivos primarios con el mimetizador y el inhibidor respectivamente. Los resultados obtenidos con los mimetizadores indican que no existen cambios en la eficiencia de replicación viral al realizar el análisis del efecto de dos concentraciones del miRNA (15 y 20 nM) mientras que el

tratamiento con los inhibidores de la función del miRNA-222 se observó un aumento significativo en la eficiencia de replicación viral. Cabe señalar que los ensayos se realizaron con eficiencias de transfección mayores al 90% y más del 90% de sobrevivencia celular.

Al observar los resultados en conjunto es de llamar la atención el efecto nulo en la replicación viral por parte de los mimetizadores cuando su contraparte, los inhibidores, tuvieron un efecto grande en la eficiencia de la replicación viral.

Los reportes en los que se han utilizado inhibidores y mimetizadores han demostrado tener efectos contrarios en la regulación de su RNA viral blanco (39, 43, 44). Uno de los trabajos más recientes ha descrito el uso de inhibidores de miRNAs específicos para rescatar la habilidad de replicación del virus de la hepatitis C cuando se sobreexpresan los miRNAs 136 y 199a. Además se demostró que la actividad inhibitoria de dichos miRNAs se elimina al mutar los sitios en los que se predice su unión (UTR 5' y región codificante para NS3) confirmando la interacción "in vivo" en las regiones predichas (44).

Sin embargo, se pueden argumentar dos hechos a estos resultados, primero, en el caso de los inhibidores los cuales son miRNAs ya procesados por el contrario en el caso de los mimetizadores se transfectan los precursores de 70pb, por lo que no podemos descartar que el procesamiento de los mimetizadores a miRNA maduro en el medio intracelular pudiese estar limitando la disponibilidad de éste para los procesos que regula. Cabe mencionar que en los tratamientos se utilizaron las mismas concentraciones de inhibidores y de mimetizadores.

Un segundo escenario que pudiera explicar este efecto es que los niveles de expresión basal del miRNA-222 en los cultivos primarios estudiados sean suficientes para los procesos de modulación que llevan a cabo y que el aumento de estos ya no pueda ejercer funciones adicionales, probablemente por que los sitios de unión se encuentren ya ocupados.

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el miRNA-222 tiene una función inhibitoria en la eficiencia replicativa del virus del dengue en los macrófagos humanos. Dicha función puede darse por la unión directa del miRNA a la UTR 3' del genoma viral o por la modulación de la expresión de moléculas en la célula huésped que a su vez inhiban la replicación del virus.

Sin embargo, es importante considerar que los resultados presentados requieren ensayos adicionales para confirmar el mecanismo por el que se inhibe el ciclo replicativo viral, para lo cual sería conveniente incrementar número de donadores y realizar curvas de concentración considerando cantidades mayores sobretodo para asegurar la disponibilidad y función de los mimetizadores. También se plantea realizar estos ensayos en los cultivos transfectados con el replicón de dengue acoplado a GFP, la estandarización de dicha transfección a los cultivos primarios de macrófagos también se realizó durante el desarrollo del presente trabajo. Esto último es importante ya que se podrían corroborar los resultados obtenidos con la infección viral pero además se podría determinar si el efecto de los inhibidores se da en la traducción o replicación del RNA viral, ya que el sistema del replicón nos permite discernir entre estos dos eventos por la temporalidad en la expresión de GFP.

CONCLUSIONES

El nivel de expresión del miRNA-222 en los cultivos primarios de macrófagos humanos no cambió en respuesta a la infección por el virus del dengue. Sin embargo, los experimentos de inhibición de la función de dicho miRNA sugieren que éste tiene una función inhibitoria en la eficiencia replicativa del virus del dengue.

Dicha función puede darse por la unión directa del miRNA a la UTR 3' del genoma viral o por la modulación de la expresión de moléculas en la célula huésped que a su vez inhiban la replicación del virus, por lo que es necesario llevar a cabo estudios más profundos que permitan establecer claramente el mecanismo de dicha inhibición.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gubler DJ. Dengue Viruses (Flaviviridae). 1999. Academic press 375:384
2. Glubler DJ. 1988. Dengue, In: Monta TP (ed). The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. CRC Press. Vol. 2 p.233.
3. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. 2004. Dengue viral infections. Postgrad. Med. J. 80: 588-601.
4. Whitehead S. Blaney J. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. Nature Rev. Microbiol. 5; 518-28.
5. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA. Actualmente disponible en el la red en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem27/pdf/cua1y2.pdf>.
6. Reyes-del Valle J y del Angel RM. 2004. Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand. J Virol. Methods. 116, 95–102.
7. Mukhopadhyay S. 2005. Kuhn RJ. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nature Rv Micro. 3, 13-22.
8. Allison, S. L et al. 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. J. Virol. 69; 695-700.
9. Guirakhoo, F., Heinz, F.X. 1991. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virus. J.Gen.Virol. 72; 1323-29.

10. Romero T.A., Tumban E. 2006. Secondary structure of dengue virus type 4 3'untranslated region: impact of deletion and substitution mutations. *J Gen Virol*; 87, 3291-96.
11. Gritsun TS, Gould EA. 2006. Direct repeats in the 3' untranslated regions of mosquito-borne flaviviruses: possible implications for virus transmission. *J Gen Virol*. 87(Pt 11):3297-305
12. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. In *Field Virology* (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 1102-1152 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001).
13. Lindenbach BD, Rice CM. 1999. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*;73(6):4611–4621.
14. Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, et al. 2001. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol*; 75(10):4633–4640.
15. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, et al. 1998. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*; 245(2):203–215.
16. Warren P, Tamura JK, Collett MS. 1993. An RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J Virol*; 67: 989-996.

17. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, et al. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res*; 17(12):4713–4729.
18. Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *J Biol Chem*; 281(13):8854–8863.
19. Koonin E.V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and $\alpha 2$ protein of reovirus.
20. Hanley KA, Lee JJ, Blaney Jr. JE, et al. 2002. Paired charge-to-alanine mutagenesis of dengue virus type 4 NS5 generates mutants with temperature-sensitive, host range, and mouse attenuation phenotypes. *J Virol*; 76(2):525–531.
21. Ackermann M, Padmanabhan R. 2001. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J Biol Chem*; 276(43):39926–39937.
22. Khromykh AA, Kenney MT, Westaway EG. 1998. trans-Complementation of flavivirus RNA polymerase gene NS5 by using Kunjin virus replicon-expressing BHK cells. *J Virol*; 72(9):7270–7279.

23. Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, et al. 1998. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*; 246(2):409–417.
24. Yon C, Teramoto T, Mueller N, et al. 2005. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*; 280(29):27412–27419.
25. Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, et al. 1997. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol*; 71(5):3466–3473.
26. De Paula SO, Lopes da Fonseca BA. 2004. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. *Braz. J. Infec. Dis.* 8: 390-398.
27. Ahmed FU, Mahmood CB, Sharma JD, et al. 2001. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in children the 2000 out break in Chittatong, Bangladesh. *Dengue Bulletin.* 25: 33-9.
28. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Rev. Microbiol.* 5: 518-528.
29. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomic, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 126; 282-97.
30. Ambros V. 2003. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*; 113, 673-76.

31. Slack, F. J. *et al.* (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell.* **5**, 659–669.
32. Kim VN. 2005. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells.* Feb 28;19(1):1-15 .
33. John B. Enright AJ. 2004. Human MicroRNA Targets. *PLoS Biol.* 2:e363.
34. Horvitz, H. R. & Sulston, J. E. 1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **96**,435–54.
35. Chen C.Z., Li L., Lodish H.F. 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*; 303, 83-6.
36. Calin G.A., Dumitru C.D. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 y miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 99, 15524-15529.
37. Esquela A., Slack F. (2006). Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Rev. Cancer.* 6; 259-69.
38. Jay C., Nemunaitis J. (2007). MiRNA profiling for Diagnosis and Prognosis of Human Cancer. *DNA and Cell Biol.* 26; 293-300.
39. Jopling CL., Yi M. 2005. Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science.* 309:1577-81

40. O'Connell RM, Taganov KD. 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1604-09.
41. Sarnow P., Jopling C.L. 2006). MicroRNAs: expresión, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nature Rev. Microbiol.* 4; 651-59.
42. Lecellier CH., Dunoyer P. 2005. A Cellular MicroRNA Mediates Antiviral Defense in Human Cells. *Science*; 308:557-60.
43. Skalsky , Samols M, Karlie B. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Encodes an Ortholog of miR-155. *Amer Soc Micro.*2007;28: 12836–12845
44. Murakami Y. Aly H. Regulation of Hepatitis C Virus genome replication by miR-136 and 199a. *Hepatology* 2008..
45. Wei-Che P. Lin LZ. 2007. ViTa: prediction of host microRNAs targets on viruses. *Nucleic Acids Res*; 35, 381-85.
46. Alvarez DE. Loderio M.F. 2005. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *J. Virol*; 79, 6631-43.
47. Hugget J., Dheda K. 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immunity*; 6, 279-84.
48. Gibco BRL. Guide to Eukaryotic Transfections with Cationic Lipid Reagents. Actualmente en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/guideforeukaryotictransfection.pdf> 06/09/05.

49. Dharmacon. miRNA: Mimics and Inhibitors. Actualmente en:
<http://www.dharmacon.com/> 06/09/05
50. Thomas B. Stim. 1970. Dengue Virus Plaque Development in Simian Cell Systems: I. Factors Influencing Virus Adsorption and Variables in the Agar Overlay Medium. *Appl. Envir. Microbiol*; 19: 751 - 756.
51. Thomas B. Stim. 1970. Dengue Virus Plaque Development in Simian Cell Systems: II. Agar Variables and Effect of Chemical Additives. *Appl. Envir. Microbiol*; 19: 757 - 762.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 29 de Agosto del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, a el Q.F.B. Manuel Arturo Escalera Cueto.

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio
Monroy

Dra. Rosa María del Ángel

Dr. Juan Salas Benito

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dra. Ma. Elizabeth Álvarez Sánchez

Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

TEL. 5512-8469
PART. 2619-0742

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.