

**EVALUACIÓN DEL PAPEL DE DOS microRNAs CELULARES EN LA  
REPLICACIÓN DEL VIRUS DENGUE**

**AUTOR:**

**Juan Camilo Castrillón Betancur**

**ASESOR:**

**Silvio Urcuqui Inchima**

**Grupo de Inmunovirología**

**Sede de Investigación Universitaria**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
MEDELLÍN  
2011**

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1. El virus Dengue (DENV)	5
1.2. Transmisión	7
1.3. Replicación	8
1.4. Patogénesis	9
1.5. Epidemiología	11
1.6. Control y prevención del dengue	12
1.7. microRNAs	13
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>17</b>
<b>3. FORMULACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
4.1. Objetivo General	21
4.2. Objetivos Específicos	21
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>22</b>
5.1. Área de trabajo	22
5.2. Cultivos celulares	22
5.3. Muestras virales	22
5.4. Constructos	22
5.5. Titulación viral	23
5.6. PCR en Tiempo Real (qPCR)	23
5.7. Amplificación del DNA plasmídico de los diferentes constructos	24
5.8. Transfección	25
5.9. Infección de células HeLa con DENV2	25
5.10. Western Blot	25
5.11. Efecto de los miR-744 y miR-484 en la replicación de DENV2	26
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
6.1. Titulación viral	27

<b>6.2.</b> El nivel de expresión de GFP es disminuido en células HeLa transfectadas con un constructo que expresa la GFP fusionada al 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4	<b>27</b>
<b>6.3.</b> Los miR-744 y miR-484 regulan negativamente la expresión de GFP, que se expresa fusionada a la 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4	<b>28</b>
<b>6.4.</b> Los miR-484 y miR-744 afectan negativamente la replicación de DENV2	<b>29</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>35</b>
<b>9. FIGURAS</b>	<b>42</b>

## RESUMEN

El virus dengue (DENV) es un importante problema de salud pública en todo el mundo y causa un espectro de enfermedades, para las que no existen tratamientos antivirales. Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA de cadena sencilla de aproximadamente 22nt, que se ha demostrado, juegan un papel importante en la regulación postranscripcional interactuando con regiones no traducidas de los mRNA. En este estudio, se pretendía determinar el efecto de los microRNAs miR-744 y miR-484 en la región 3' no traducida o 3'UTR de DENV2, una secuencia que participa activamente en la regulación, traducción y en la replicación del genoma viral. El conjunto de resultados indican que existen secuencias en el 3'UTR de DENV2 que son reconocidas por los miR-484 y miR-744, y dicho reconocimiento hace que estos miRNAs puedan bloquear la replicación del DENV2 en células HeLa. Estos resultados son de vital importancia ya que revelan a los microRNAs como una posibilidad de tratamiento del dengue.

**Palabras clave:** Dengue Virus (DENV), microRNAs, 3'UTR.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El virus Dengue (DENV)

El DENV es miembro de la familia *Flaviviridae* y pertenece al género *Flavivirus*, con un tamaño de aproximadamente 60nm de diámetro para su forma madura y 50nm para su forma inmadura. La partícula viral está constituida por una envoltura de origen celular con incrustaciones de glicoproteínas que son codificadas por el genoma viral. Más internamente se encuentra la cápside, que rodea el genoma viral (Perera y Kuhn, 2008). Su genoma consta de una sola cadena de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb, con un solo marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína, la cual al ser procesada por proteasas celulares y virales, da origen a tres proteínas estructurales: de cápside (C), de membrana (pr-M) y de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. La proteína E es la de mayor peso molecular (53 kDa) entre las proteínas estructurales y presenta tres dominios antigénicos. Esta proteína es glicosilada, expuesta en la superficie de la partícula viral y es la responsable de la unión a los receptores celulares y de la entrada del virus a la célula (Chambers et al., 1990). La proteína pr-M (27-31 kDa) al ser cortada por una furina en el trans-Golgi da origen a la proteína M, la cual es posteriormente glicosilada. El corte de pr-M es esencial para la maduración de la partícula y para obtener una progenie viral infecciosa (Perera y Kuhn, 2008). La proteína C, es un homodímero (11 kDa) esencial para la encapsidación del RNA viral. Es una proteína con un alto contenido de aminoácidos básicos, aproximadamente el 20%, lo que permite neutralizar parcialmente las cargas negativas del genoma viral (Stanley, 1950).

Las proteínas NS hacen parte del complejo de replicación del RNA viral y participan activamente en la patogénesis. Las proteínas NS3 y NS5 son consideradas las más importantes debido a que ambas tienen actividad enzimática indispensable para la replicación viral (Noble et al., 2010). NS3 es una proteína multifuncional (70 kDa), presenta actividad proteasa en su dominio N-terminal en asociación con NS2B (14 kDa), y actividad helicasa y RNA trifosfatasa en su dominio C-terminal (Lescar et al., 2008). La proteína NS5 (100 kDa), es la más grande y

conservada entre los Flavivirus. Posee un dominio N-terminal con actividad metiltransferasa, esencial para la formación de la estructura 5'Cap, que es necesaria para la iniciación de la traducción del mRNA; y un dominio C-terminal con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) indispensable para la replicación del genoma viral (Bollati et al., 2010). Es decir, las proteínas NS interactúan con factores celulares para formar los complejos de replicación, implicados en la síntesis del RNA complementario de polaridad negativa (RNA<sup>(-)</sup>), lo que conlleva finalmente al establecimiento de un RNA intermediario de doble cadena (dsRNA).

El genoma de DENV está flanqueado por regiones 5' (~100 nucleótidos) y 3' (~400–800 nucleótidos) no traducidas o UTRs, que juegan un papel importante en la síntesis de RNA viral (Yu et al., 2008). 3'UTR contiene dos estructuras secundarias en forma de horquilla, conocidas como 3'-SL (del inglés 3'- Stem Loop), con una longitud que puede variar entre 90 a 120 nucleótidos dependiendo del serotipo (Figura 1). Ambas estructuras son importantes por ser elementos promotores determinantes para la replicación y la traducción viral; además, son las estructuras más conservadas dentro de las especies de Flavivirus (Weaver y Vasilakis, 2009). Se ha descrito que proteínas celulares como el factor de traducción EF-1 $\alpha$  (del inglés Elongation factor-1  $\alpha$ ) y la proteína PTB (del inglés Pyrimidine Tract Binding) pueden interaccionar con la región 3'-SL del virus, formando complejos necesarios para la replicación, por lo que se cree que PTB y EF-1 $\alpha$  podrían tener una función como chaperonas para mantener la estructura del RNA en una conformación que favorezca la replicación de DENV (De Nova-Ocampo et al., 2002). También se ha encontrado en la 3'UTR, secuencias conservadas llamadas CS1, CS2A y CS2B que juegan un papel muy importante en la replicación viral, ya que una delección parcial o total de algunas de estas regiones puede reducir la replicación viral o generar la pérdida de viabilidad de la progenie viral (Men et al., 1996). Igualmente se ha reportado que la región CS1 contiene una secuencia de circularización (CS) (Figura 1), que es complementaria a otra secuencia presente en 5'UTR del genoma viral (Alvarez et al., 2005a). Recientemente Álvarez *et al.*, describieron una secuencia localizada corriente

arriba del codón de iniciación de la traducción (Edelman et al.) en la 5'UTR, complementaria a una región presente en 3'-SL denominada 5' y 3' UAR (del inglés Upstream AUG Region) (Figura 1), que también es imprescindible para la circularización del RNA y por consiguiente, para la síntesis del genoma viral (Alvarez et al., 2005b).

De la misma manera, la 5'UTR contiene dos estructuras en forma de horquilla; una corta o SLB y una larga o SLA (Figura 1) (Alvarez et al., 2008). Se ha demostrado recientemente que la estructura SLA actúa como un elemento promotor para la síntesis de RNA, reconocido por la RdRp viral (Filomatori et al., 2006). El extremo 5' posee además, una estructura Cap (N7meGpppA2'Ome-RNA), que juega un papel importante, así como para los mRNA celulares, para iniciar el proceso de traducción y proteger al RNA viral de la degradación por exonucleasas endógenas (Bollati et al., 2010).

## 1.2. Transmisión

El DENV es transmitido por mosquitos del género *Aedes*, principalmente por las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, que están establecidos en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Estos mosquitos son el principal vector del virus y están muy bien adaptados a la vida urbana, donde se reproducen en aguas estancadas generadas por el hombre (Wilder-Smith y Gubler, 2008). Estas especies permanecen activas durante el día, pero generalmente se alimentan temprano en la mañana o al atardecer (Rigau-Perez et al., 1998). Para que la transmisión del virus ocurra, la hembra debe picar una persona infectada durante la fase de viremia, la cual generalmente dura entre cuatro a cinco días, pero puede durar hasta doce días. Además, se necesita de un periodo de incubación extrínseco, que generalmente dura de 8 a 12 días, para que el mosquito se vuelva infectivo. Después de esto, el mosquito puede transmitir el DENV por picaduras a un individuo susceptible. *A. aegypti* puede estar infectado con dos serotipos diferentes de DENV, sin que cada serotipo de virus afecte el rendimiento del otro (McBride y Bielefeldt-Ohmann, 2000).

Es de anotar que la infección por el DENV no tiene un efecto patogénico directo sobre sus vectores. Después de la ingestión de sangre que contiene el virus, hay una infección de las células epiteliales del intestino del mosquito. El virus luego escapa al hemocele e infecta las glándulas salivares donde pueden ser secretados por la saliva. El tracto genital también es infectado y los virus pueden entrar a los huevos en el momento de la ovoposición (McBride y Bielefeldt-Ohmann, 2000).

### **1.3. Replicación**

Basado en la información encontrada en la literatura, un modelo general para la replicación del virus es el siguiente: el virus entra a la célula por endocitosis después de la interacción directa de la glicoproteína E con receptores celulares, como el receptor DC-SIGN (del inglés DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin) y el receptor de Manosa (Miller et al., 2008; Tassaneetrithep et al., 2003). Luego de su internalización, el pH del medio endosomal baja, lo que conlleva a un cambio conformacional irreversible de la proteína de envoltura del virus, facilitando su fusión con la membrana endosomal de la célula hospedera. En consecuencia, la nucleocápside es liberada en el citoplasma y luego de la desencapsidación, el genoma es reconocido por los ribosomas y factores celulares implicados en la traducción, lo que conlleva a la síntesis de la poliproteína viral precursora (Mukhopadhyay et al., 2005). La poliproteína es procesada por proteasas de origen viral (NS2B/NS3) y celular (Furina), dando origen a las proteínas estructurales y NS, necesarias para el ensamblaje de las nuevas partículas virales (Murthy et al., 1999).

Después de la traducción del RNA viral, las proteínas virales inducen una hipertrofia de las membranas intracelulares, originando estructuras conocidas como paquetes vesiculares dentro de las cuales ocurre la síntesis del RNA viral. El proceso comienza con la síntesis de una cadena de RNA negativa (RNA<sup>(-)</sup>) que sirve como molde para la producción de nuevos RNA geonómicos de cadena positiva. La reacción enzimática es catalizada por la actividad de la proteína viral NS5 en asocio con NS3 y otras proteínas NS virales; además, factores celulares también pueden estar implicadas en ese proceso (Villordo y Gamarnik, 2009). Una



vez la polimerasa viral NS5 se une al promotor 5'SLA, las interacciones RNA-RNA mediadas por las secuencias complementarias presentes en las 5' y 3'UTR, permiten la circularización del genoma, lo que facilita que la RdRp alcance la 3'UTR, para usarlo como molde en la síntesis de RNA<sup>(-)</sup> (Figura 2) (Filomatori et al., 2006). Todo este proceso se lleva a cabo en lo que se conoce como complejo de replicación.

Las nuevas cadenas de RNA<sup>(+)</sup> sintetizadas, son encapsidadas por la proteína C, formando lo que se conoce como nucleocápside (NC); esta a su vez es cubierta por el heterodímero prM-E, lo que constituye una partícula inmadura, que gema desde el lumen del retículo endoplasmático (Urcuqui-Inchima et al., 2010). Hasta aquí se tiene una partícula viral no infecciosa, la cual al pasar por el la región trans-golgi, sufre un rearrreglo consecuencia del procesamiento de prM y de la homodimerización de E, lo que permite finalmente la formación de nuevas partículas virales infecciosas (Villordo y Gamarnik, 2009). Las nuevas partículas virales se desplazan hacia la membrana celular donde son liberadas por exocitosis.

#### **1.4. Patogénesis**

A la fecha se ha descrito cuatro serotipos de DENV: DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4. La infección con cualquiera de ellos confiere inmunidad protectora específica para el serotipo, pero no para los otros tres, por lo que un individuo puede infectarse hasta cuatro veces con el DENV. La infección con cualquiera de los 4 serotipos causa un espectro de enfermedades que varía desde un caso asintomático o una leve fiebre conocida como dengue clásico (Miller et al.), hasta una típica fiebre de dengue hemorrágico (FDH) o una severa y fatal enfermedad hemorrágica (Wilder-Smith y Gubler, 2008). El DC es una enfermedad febril que tras un periodo de incubación de dos a siete días evidencia una repentina aparición de fiebre alta, dolor de cabeza, mialgia, artralgia, vómito y náuseas (Guzman y Kouri, 2002). Estos síntomas pueden ir acompañados de adenopatía, leucopenia y diferentes grados de trombocitopenia, pero usualmente hay una recuperación de los síntomas una semana después de la aparición de la

enfermedad (Kurane, 2007). Otros pacientes infectados, pero en una menor proporción, manifiestan la extravasación de plasma a espacios intersticiales, además de trombocitopenia y algunas manifestaciones hemorrágicas como petequias, equimosis, epistaxis o sangrado gastrointestinal (Guzman y Kouri, 2002). La repentina permeabilización vascular es generada por citoquinas proinflamatorias, producidas por activación de la respuesta innata o por los linfocitos T al ser activados por la infección (Halstead, 2007). Se ha encontrado que pacientes con dengue severo presentan altas concentraciones de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y IL-2, las cuales actúan directamente sobre células endoteliales vasculares e inducen la permeabilidad vascular y posteriormente la pérdida de plasma sanguíneo (Chakravarti y Kumaria, 2006; Nguyen et al., 2005). Pacientes con dicho cuadro clínico se los cataloga en estado de FDH, que es la condición más grave y potencialmente mortal (Kurane, 2007). FDH es clasificado en cuatro grados de severidad: los grados I y II son considerados leves y los grados III y IV, severos. Los grados severos se conocen como Síndrome de Shock por Dengue (SSD) y en este caso, los pacientes muestran un deterioro hasta presentar fallas en el sistema circulatorio, pulso rápido y débil, disminución en la presión sanguínea y un estado mental alterado (Guzman y Kouri, 2002).

No obstante, lo que define el cuadro clínico (dengue) de la infección por DENV no se ha podido esclarecer totalmente, aunque se han postulado diferentes hipótesis para explicar la progresión de la enfermedad. Basados en estudios epidemiológicos que reportan que los individuos que son infectados por segunda vez, pero con un serotipo diferente al de la primera infección, presentan un mayor riesgo de padecer FDH; se ha propuesto la hipótesis que sugiere que la severidad de la infección es dependiente de anticuerpos generados durante una primoinfección. Es decir, anticuerpos no neutralizantes preexistentes específicos (primera infección), pueden formar complejos con otro serotipo (segunda infección), los cuales se unen al receptor Fc presente en las células fagocíticas mononucleares; conllevando a un aumento de la internalización del virus, y por ende, a un incremento de la replicación del virus en la célula infectada, lo que genera un aumento en la viremia y la severidad de la enfermedad. La hipótesis se

conoce como amplificación dependiente de anticuerpos (Goncalvez et al., 2007). Sin embargo, FDH también puede ocurrir durante una infección primaria, lo que sugiere la intervención de otros factores. Se ha reportado que puede existir una fuerte relación entre la severidad de la enfermedad y el origen étnico del individuo, la virulencia de la cepa viral y el background genético del hospedero (Cologna et al., 2005; Nguyen et al., 2008; Restrepo et al., 2008).

### **1.5. Epidemiología**

Se cree que la pandemia de dengue comenzó en regiones de Asia y el pacífico, durante y después de la segunda guerra mundial. Los cambios ecológicos que ocurrieron durante esa época, probablemente favorecieron la expansión geográfica del vector del DENV. Además, el alto número de individuos susceptibles (poblaciones locales y soldados) y su alta movilidad, posiblemente crearon las condiciones necesarias para la dispersión del DENV (Guzman y Kouri, 2003).

La emergencia y reemergencia de dengue puede ser atribuida a un gran número de causas. Cambios sociales y demográficos como el crecimiento poblacional y la urbanización sin planeación, resultan en el hacinamiento de comunidades que viven en centros urbanos con viviendas deficientes e inadecuados sistemas de proporción de agua, alcantarillado y manejo de residuos. Cuando estos factores se combinan, sumados a un incremento en la migración de individuos a áreas endémicas del mosquito vector, el deterioro de las medidas de control del mosquito y los limitados recursos económicos y humanos dedicados a la infraestructura de salud pública; hacen que el dengue pueda establecerse como una enfermedad persistente en una población (Guzman y Kouri, 2004).

La mayoría de casos de FDH han sido reportados en Asia, donde la enfermedad ha afectado la mayoría de países, y es la principal causa de hospitalización y muerte en niños. En América, FDH era una rara patogénesis antes de 1981. Desde ese momento la epidemia de DC y FDH ha llegado a ser una de los mas importantes problemas de salud pública en la región (Gubler, 2002). En la única región tropical donde no es considerado un problema es en África, donde el virus

solo existe en ciclos epizoóticos y enzoóticos silvestres donde el hombre no interviene como hospedador (McBride y Bielefeldt-Ohmann, 2000).

Actualmente el DENV ha sido identificado en más de cien países, y FDH ha sido documentado en mas de 60 países (Gubler, 2002). Aproximadamente entre 2500 y 3000 millones de individuos en todo el mundo están en riesgo de infección por DENV, debido a que en términos de morbilidad y mortalidad, es el arbovirus más importante que afecta al hombre en zonas tropicales y subtropicales, con un estimado de individuos infectados que varía entre 50 y 100 millones de personas por año (Halstead, 2007). Entre 250.000 y 500.000 individuos infectados con el virus, desarrollan dengue severo cada año, de los cuales mueren 24.000, pero la mayoría de las infecciones llegan a un curso clínico leve (Rajapakse, 2009).

Según registros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el 2009 se reportaron 853.468 casos de dengue en el continente Americano, incluyendo 20.832 casos de dengue hemorrágico y formas complicadas de dengue y 326 defunciones, con una tasa de letalidad regional de 1,7% (OPS, 2009).

De esta forma, el DENV puede ser clasificado epidemiológicamente como de bajo, medio o alto impacto. Algunos virus pueden permanecer en ciclos silvestres de poca o baja transmisibilidad a humanos; otros producen solo DC y algunos genotipos han sido asociados con el potencial para causar FDH y SSD. Así, los genotipos americanos DENV2 y DENV3, son menos virulentos comparados con los genotipos asiáticos DENV2 y DENV3 (Wilder-Smith y Gubler, 2008).

### **1.6. Control y prevención del dengue**

Entre 1950 y 1970, los esfuerzos por controlar la fiebre amarilla en el continente Americano llevaron a la casi eliminación de las poblaciones de *A. aegypti*, pero el abandono de los programas de erradicación en 1970, llevó a su reestablecimiento (Weaver y Vasilakis, 2009). Actualmente el principal objetivo de la mayoría de los programas de control es reducir la densidad del vector del DENV y mantenerlo en niveles bajos. Los controles para el vector, se llevan a cabo eliminando contenedores que son el hábitat favorable para la ovoposición y el desarrollo de las etapas tempranas del mosquito; o mediante la aplicación de insecticidas que

controlan su fase adulta (WHO, 2009). Sin embargo, en países endémicos donde la situación económica no es muy favorable, estos programas de control se han venido deteriorando cada vez más debido a que son difíciles de sostener y requieren una mano de obra intensiva.

Como método alternativo para su control, se han realizado grandes esfuerzos enfocados a desarrollar vacunas efectivas que prevengan la enfermedad; sin embargo, son muchos los problemas que faltan por resolver, además que es necesario de una vacuna capaz de controlar los 4 serotipos de DENV (Guy y Almond, 2008). Es necesario entonces, continuar con la investigación y búsqueda de tratamientos alternativos que sean económicamente factibles, seguros y eficaces para una inmunización tetravalente.

### **1.7. microRNAs**

La inhibición de la expresión de genes virales involucrados en la replicación del DENV, constituye una de las mejores estrategias en la lucha contra el DENV. Aun más si se tiene en cuenta que hasta la fecha no existe una vacuna para prevenir la infección o un medicamento para su tratamiento. Desde la descripción de los microRNAs (miRNA) como una herramienta útil para el silenciamiento de genes, su aplicación en diferentes campos de la ciencia o para el tratamiento de enfermedades, no ha tenido límites.

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de cadena sencilla de aproximadamente 22nt, que se ha demostrado, juegan un papel importante en la regulación postranscripcional de la expresión génica de todas las células de organismos eucariotas (Cullen, 2006).

La transcripción de los genes de miRNAs en organismos eucariotas es llevada a cabo por la RNAPol II o III, que resulta en la producción de un transcripto primario o pri-miRNA de una longitud que varía entre 200 hasta varios miles de nucleótidos, con numerosas bases desapareadas y una estructura en forma de asa (Ghosh et al., 2009). El primer paso en el procesamiento del miRNA, involucra el reconocimiento y el clivaje del pri-miRNA por un complejo protéico conocido como

microprocesador, compuesto por Drosha (una RNasa tipo III) y DGCR8 (del inglés DiGeorge-syndrome critical-region protein 8) (Scaria et al., 2007). Este clivaje genera un pequeño pre-miRNA de aproximadamente 60 nt con una estructura en forma de asa y una proyección (Overhang) de 2nt en el extremo 3', el cual es transportado, por el complejo Exportina 5 y Ran-GTP, hacia el citoplasma (Qi et al., 2006). Una vez llega allí, la hidrólisis de GTP resulta en la liberación del pre-miRNA, el cual es ligado a una segunda RNasa III conocida como Dicer, junto con su cofactor TRBP (del inglés transactivating region RNA-binding protein). Dicer se une a la proyección de 2nt en el extremo 3' del pre-miRNA y remueve el bucle terminal dejando una segunda proyección de 2nt en el otro extremo 3' y generando un miRNA intermediario de doble cadena de aproximadamente 22nt, que contiene una cadena madura o miRNA y su cadena complementaria miRNA\* (Cullen, 2006; He y Hannon, 2004). Posteriormente, Dicer permite el ensamblaje del miRNA de doble cadena, en un complejo de silenciamiento inducido por RNA llamado RISC (del inglés RNA-induced silencing complex). Este complejo hace que la cadena madura del miRNA sea incorporada selectivamente en el complejo, mientras que la cadena miRNA\* es degradada rápidamente. Esta selección es basada en características termodinámicas, estructurales y de estabilidad de las cadenas (He y Hannon, 2004). En el nuevo complejo formado, el miRNA actúa como guía para dirigir a RISC hacia las cadenas complementarias de mRNA blanco. Así, los miRNA pueden inducir una degradación del mRNA o inhibir la traducción, dependiendo del grado de complementariedad entre el complejo RISC-miRNA y el extremo 3'UTR del mRNA blanco. Si la complementariedad es perfecta generalmente resulta en la degradación del mRNA, pero si es incompleta, inhibe la traducción del mRNA blanco (Figura 3) (Qi et al., 2006).

En la actualidad, los miRNAs celulares constituyen una de las moléculas más exploradas porque se ha descrito que pueden tener un efecto antiviral. El virus PFV (del inglés Primate Foamy Virus), el virus de la Hepatitis C (VHC) y el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), son algunos de los virus que se ha descubierto son blanco de miRNAs celulares (Scaria et al., 2007). Por ejemplo, el miRNA celular miR-32, restringe la acumulación del virus PFV-1 en células

humanas, aunque PFV-1 puede codificar una proteína llamada Tas, que suprime las funciones del miRNA (Lecellier et al., 2005). También se ha encontrado que el extremo 3' del mRNA de VIH-1 es el blanco para un grupo de miRNAs expresados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 y miR-382) que pueden inhibir su traducción provocando un estado de latencia de la infección en estas células (Huang et al., 2007).

Además, estudios recientes han demostrado que el tropismo específico de algunos virus puede ser atenuado, si se inserta secuencias blanco de miRNAs en sus genomas, que inhiben su diseminación en tejidos que expresan el miRNA que tiene como blanco la secuencia insertada. Por ejemplo, como la infección del hígado por el DENV, puede contribuir a la patogénesis viral, Lee *et al.*, insertaron un elemento de reconocimiento para miRNA-122, que es específico de tejido hepático, en la 3'-UTR del genoma de DENV obteniéndose como resultado, una susceptibilidad inhibitoria del replicón del DENV ante la presencia del miRNA-122; sugiriendo que este mecanismo puede restringir la replicación del virus en un tejido específico como el hepático (Lee et al., 2010).

No obstante, durante el curso de la evolución, los virus también han desarrollado mecanismos para aprovechar la maquinaria de biosíntesis de la célula hospedera y evadir los mecanismos de defensa propios de la célula. Los estudios han revelado que la compleja interacción entre virus y célula hospedera involucra el silenciamiento de algunas vías a través de los miRNAs (Ghosh et al., 2009). Igualmente, los virus también producen sus propios miRNAs que ofrecen ventajas para la reorganización del ambiente celular con el fin de maximizar la replicación viral, al proveer una forma altamente específica de disminuir la expresión de genes de la célula hospedera, que podrían interferir con el ciclo de replicación viral (Cullen, 2006). Se ha reportado que la regulación de la proteína PUMA (Del inglés p53 up-regulated modulator of apoptosis), un factor pro-apoptótico que al interactuar con p53 produce la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9, por un miRNA propio del Epstein Barr virus (EBV) conocido como miR-BART5, permite la sobrevivencia celular y el establecimiento de una infección latente (Choy et al., 2008). Además, se ha encontrado que el miRNA miR-122

estimula la traducción de proteínas del VHC en hepatocitos, al favorecer la asociación de los ribosomas con el mRNA viral. Esta estimulación es conferida por la interacción directa del miRNA con dos blancos presentes en la región 5'-UTR del virus (Henke et al., 2008).



## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hasta el siglo XIX, solo nueve países habían experimentado casos de FDH, por lo que el dengue era considerado una enfermedad esporádica con brotes epidémicos que surgían escasamente entre largos intervalos de tiempo (WHO, 2010). Sin embargo, hoy en día es considerada, a nivel mundial, como una de las enfermedades más importantes transmitidas por mosquitos ya que en los últimos cincuenta años la incidencia de la patogénesis de DENV, tanto en su forma leve, como severa, ha incrementado en una tasa alarmante (WHO, 2010). Entre las causas de ese incremento se encuentran los cambios sociales y demográficos como el crecimiento poblacional y la urbanización, que sumados a la falta de programas de vigilancia, prevención y control, contribuyen a la propagación del vector (Clements et al., 2010). Se estima que cerca de 2.500 millones de personas distribuidas en más de cien países están en riesgo de contraer la infección. Se ha reportado hasta 50 millones de infecciones anuales, de las cuales 500.000 son casos de DHF con 22.000 muertes, principalmente niños (WHO, 2010).

Por tanto, el reto para los organismos de salud nacional e internacional, es invertir la tendencia de aumento del dengue epidémico y por ende, el aumento de incidencia de dengue hemorrágico. Para ello se ha generado grandes esfuerzos enfocados a desarrollar una vacuna efectiva que prevenga la enfermedad. Entre los enfoques establecidos, la generación de cepas virales atenuadas como método tradicional ha tenido grandes decepciones, debido a que el desarrollo de una vacuna contra el DENV implica inmunizar simultáneamente contra los cuatro serotipos, lo que constituye una tarea difícil de realizar (Webster et al., 2009). Igualmente, el comercio mundial y la globalización han facilitado el intercambio genético entre cepas virales, lo que lleva a la aparición de nuevas cepas con mayor potencial epidémico y de virulencia. Los más recientes esfuerzos para producir vacunas atenuadas han utilizado técnicas moleculares para generar cepas modificadas genéticamente. Aunque se ha logrado un cierto nivel de éxito con estos últimos enfoques, aún no se ha podido llegar a una solución económicamente factible, segura y eficaz para una inmunización tetravalente

(Edelman et al., 2003; Konishi et al., 2000; Lescar et al., 2008; Noble et al., 2010; Webster et al., 2009).

Por tal motivo, combatir la infección viral teniendo como objetivo vías y proteínas virales, sólo ha sido posible en pocos virus, ya que la resistencia viral y la toxicidad de la droga han sido los problemas más grandes en el momento de realizar una terapia antiviral. Con los avances logrados en el campo de los miRNAs y teniendo en cuenta que cada día se incrementa su uso como una alternativa terapéutica para el control de diferentes enfermedades, se comienza a mirar a los miRNAs como un mecanismo de defensa antiviral. El descubrimiento de miRNAs celulares capaces de reconocer secuencias blanco en las regiones no codificantes del genoma del DENV, sería de vital importancia como una posibilidad de tratamiento del dengue, enfermedad para la cual no existe hasta el momento ninguna vacuna o droga terapéutica.

### 3. FORMULACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

Los miRNAs han sido reportados en casi todos los sistemas biológicos que han sido analizados hasta la fecha. En la actualidad, cerca de 700 miRNAs han sido descritos en humanos, pero según predicciones bioinformáticas, se ha postulado que pueden ser expresados 500 miRNAs más (Seto, 2010). Debido a esto, y aunque representan sólo del 0.5 al 3% del genoma, los miRNAs tienen la capacidad de regular cerca del 20 al 30% de todos los genes humanos (Taylor y Gant, 2008). Además, actúan de tal forma que pueden regular la invasión por un virus teniendo un efecto inhibitorio sobre el ciclo de vida viral (Grassmann y Jeang, 2008), aunque por definición, la función de los miRNAs no es la respuesta antiviral. Esto ha conllevado a que recientemente se estudie el efecto que pueden tener ciertos miRNAs sobre virus que causan infecciones en el hombre. Por tal razón, aunque los mecanismos de regulación de los miRNAs no han sido perfectamente esclarecidos, estudios que tengan como objetivo evaluar el efecto de algunos miRNAs en la infección por el DENV, son muy pertinentes y oportunos, ya que podría proveer información sobre nuevas formas terapéuticas para el control de enfermedades como el dengue. Esto adquiere más importancia si se tiene en cuenta que el dengue es un problema de salud pública, con un alto poder epidémico en países tropicales y subtropicales, y a la fecha, no se dispone de un procedimiento adecuado para el tratamiento de los pacientes y tampoco existe una vacuna efectiva para ninguno de los 4 serotipos.

Teniendo en mente dicha perspectiva, en el año 2009, se realizó un trabajo de grado titulado “*Estudio preliminar de posibles blancos de microRNA en la región 3' no traducida del genoma del virus Dengue, serotipo 2*”. Dicho trabajo tuvo un componente experimental *in vitro* y otro bioinformático. En el primer caso, lo que se pretendía era determinar si existen miRNAs celulares capaces de reconocer secuencias blanco en la 3'UTR de DENV2. Para ello, la estrategia que se siguió fue la siguiente: se clonó la 3'UTR de DENV2 en el vector pEGFP-C1; esto permitió obtener un constructo que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) y corriente arriba contiene el 3'UTR viral; de tal manera que al transfectar células con dicho constructo y si existen miRNAs que reconocen secuencias del 3'UTR, la

expresión de GFP va a ser afectada. En efecto, los resultados mostraron que si se transfecta células HeLa con dicho constructo, hay una disminución en la expresión de GFP, comparado con la expresión del plásmido que expresa solamente la GFP. Con el componente bioinformático lo que se hizo fue realizar predicciones sobre la existencia de blancos de miRNAs celulares en el 3'UTR de los 4 serotipos de DENV. Esos estudios permitieron establecer que existen dos miRNAs, miR-484 y miR-744 que reconocen secuencias blanco en el 3'UTR de los 4 serotipos. Lo más interesante de este estudio, es que las secuencias blanco en el 3'UTR se encuentran en la secuencia conservada (CS) y la UAR, presentes en dicha región. Como se mencionó anteriormente, esas dos regiones juegan un papel muy importante en la replicación y expresión del genoma viral. El conjunto de esos dos resultados sugieren que muy posiblemente existen miRNAs celulares capaces de reconocer secuencias en 3'UTR con posibles implicaciones en la replicación del virus.

Por tal razón, el principal objetivo del presente trabajo es determinar si miR-484 y miR-744 juegan o no un papel importante en la regulación de la expresión del genoma del DENV2. Este tipo de estudios permitirá avanzar en el entendimiento del papel de los miRNAs celulares en la infección por el DENV2, con miras a ser usados en una posible estrategia terapéutica en la lucha contra el dengue.

Con base en los antecedentes expuestos, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Es la región 3'UTR del genoma de DENV1, DENV2 y DENV4 blanco de los dos miRNAs celulares de interés?

¿Tienen los miRNAs celulares miR-484 y miR-744 algún efecto en la replicación viral *in vitro* del DENV2?

De tal manera que la hipótesis a evaluar fue la siguiente: los miRNAs celulares miR-484 y miR-744 pueden disminuir la replicación del DENV2 al reconocer secuencias blanco en la 3'UTR del genoma viral, inhibiendo la síntesis de la poliproteína y por consiguiente, afectar la generación de nuevas partículas virales.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de los miRNAs celulares, miR-744 y miR-484, en el ciclo replicativo del DENV.

### **4.2. Objetivos específicos**

Evaluar el nivel de expresión de GFP en células HeLa transfectadas con un constructo que expresa la GFP fusionada al 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4.

Determinar el efecto de miR-744 y miR-484 en la 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4, a través de la expresión de GFP, usada como gen reportero.

Evaluar el efecto *in vitro* de los miR-744 y miR-484 en la replicación de DENV2 en células HeLa.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Área de trabajo**

Laboratorio 532 5º piso Torre 2, grupo de Inmunovirología, Sede de Investigación Universitaria (Choy et al.), Universidad de Antioquia.

### **5.2. Cultivos celulares**

Todos los ensayos del presente estudio se realizaron en células HeLa (línea celular de carcinoma cervical), cultivadas en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 1% vitaminas, 1% L-glutamina y 1% aminoácidos; e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

### **5.3. Muestras virales**

Para el estudio se usó el serotipo de DENV2, HAITÍ, donado por el Prof. Francisco Javier Díaz (Grupo Inmunovirología, Universidad de Antioquia).

Para el crecimiento del DENV2 se cultivó células C6/36HT en medio L15 suplementado con 10% de SFB y 1% L-glutamina, a 34°C y sin CO<sub>2</sub>. La monocapa celular (una botella de 75cm<sup>2</sup>) se infectó con 1x10<sup>5</sup> copias de RNA viral; a los 5 días pos-infección se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta el momento de ser usado.

### **5.4. Constructos**

Previamente se había clonado la 3'UTR del genoma de los serotipos de DENV1, DENV2 y DENV4, en el vector pEGFP-C1 (Clontech), para obtener los constructos pGUD-D1, pGUD-D2 y pGUD-D4 (figura 4), respectivamente. Es decir, el fragmento de interés (~625nt) que contiene los últimos 175nt del gen que codifica por la proteína viral NS5 hasta el penúltimo nucleótido del genoma de DENV, se clonó corriente abajo del gen que codifica por la GFP. Estos plásmidos fueron generados durante la tesis titulada "*Estudio preliminar de posibles blancos de microRNA en la región 3' no traducida del genoma del virus Dengue, serotipo 2*".

Los genes que codifican por los miR-744 y miR-484, clonados en pEZX-MR03 (Figura 5), se obtuvieron de la casa comercial GeneCopia, Inc. Por tanto, los

constructos permiten obtener, después de ser transfectados en una línea celular, los miR-744 y miR-484 maduros. Además, el constructo pEZX-MR03, porta el gen que codifica por la GFP, lo que permite determinar la eficiencia de la transfección por microscopia de fluorescencia.

La generación de la curva estándar para la titulación de los stocks virales se hizo a partir del clon infeccioso pD2/lc-Em el cual contiene el genoma completo del DENV2 (Cologna y Rico-Hesse, 2003).

### **5.5. Titulación viral**

La titulación del stock viral se realizó por PCR en tiempo real (qPCR) usando una curva estándar generada graficando el valor Ct (del inglés Critical treshold) obtenido de la qPCR contra el número de copias de pD2/lc-Em que contiene el genoma completo de DENV2. El número de copias del plásmido fue calculado a partir del número de Avogadro, la concentración del plásmido, el peso molecular promedio de un pb (660g/mol) y el número de pares de bases del plásmido (Sachs et al., 2011). La concentración del plásmido fue diluida hasta  $3.6 \times 10^6$  copias/ $\mu$ L y luego se hicieron diluciones seriadas en un factor de 10 hasta obtener  $3.6 \times 10^3$  copias/ $\mu$ L.

### **5.6. PCR en Tiempo Real (qPCR)**

El RNA viral fue aislado a partir del stock viral usando Qlamp Viral RNA mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de este, se sintetizó cDNA por RT-PCR, en un volumen final de 20 $\mu$ L usando RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). La concentración final de los reactivos en el Mix fue de: 10ng/ $\mu$ L de primers Random, 41ng/ $\mu$ L de RNA, 1X buffer de reacción, 1U/ $\mu$ L RiboLock RNase Inhibitor, 1mM dNTP Mix y 10U/ $\mu$ L RevertAid Reverse Transcriptase. Las condiciones para la generación del cDNA fueron: 65°C 5min, 4°C 1min, 25°C 5min, 42°C 60min y 70°C 5min.

Para la qPCR se utilizó Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Fermentas), en un volumen final de 20 $\mu$ L. La concentración final de los reactivos fue de: 1X Master Mix, 1 $\mu$ M primers específicos para DENV2 y 1 $\mu$ L de cDNA. El perfil de

temperaturas fue: 95°C 10min, seguido de 40 ciclos de 94°C 30s, 58 °C 30s, 72 °C 50s y una amplificación final a 72 °C 5min.

Los primers específicos para DENV2 amplifican un fragmento de aproximadamente 625 nucleótidos que abarca parte de la región codificante para la proteína NS5, y toda la región 3'UTR del genoma del DENV2. Las secuencias de los primers son las siguientes:

Sentido: 5' GAATTCGTAGGTGCGGCTCATTGATTGGGCTAAC 3'

Antisentido: 5' GTCGACGAACCTGTTGATTCAACAGCACC 3'

### **5.7. Amplificación del DNA plasmídico de los diferentes constructos**

Los constructos utilizados durante el estudio fueron amplificados realizando transformaciones de bacterias competentes obtenidas a partir del siguiente protocolo: bacterias *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) fueron inoculadas en 100mL de medio LB (Luria Bertani) e incubadas por 18 horas a 250 rpm y 37°C hasta obtener una densidad óptica de aproximadamente 0.5. Las bacterias se dejaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 4000rpm; el precipitado se resuspendió en 20mL de CaCl<sub>2</sub> (50mM) y se dejó en hielo por 40 minutos. Las bacterias fueron centrifugadas nuevamente durante 10 minutos a 4000 rpm y finalmente se resuspendieron en 4mL de CaCl<sub>2</sub> (50mM) para ser utilizadas para la transformación después de haberlas dejado en hielo por mínimo dos horas.

Para la transformación, 1 $\mu$ g de plásmido fue adicionado en 150  $\mu$ L de bacterias competentes, se dejó 30 minutos en hielo y luego se pasó durante un minuto a 42°C para nuevamente dejar en hielo por 3 minutos. Finalmente se dejaron incubando en 300 $\mu$ L de LB a 37°C y 250rpm por una hora y se sembraron en agar LB con 50 $\mu$ g/mL de Kanamicina para las células transformadas con los constructos pGUD, o ampicilina (100 $\mu$ g/mL) para las bacterias transformadas con pEZX-MR03 y pD2/Ic-Em; finalmente se incubaron a 37°C por 18h. De todas las colonias obtenidas, se seleccionó una, la cual se inoculó en 250ml de medio LB con su respectivo antibiótico a 37°C por 24h. El DNA plasmídico se purificó usando QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen). La concentración de los plásmidos fue



determinada usando un NanoDrop 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

### **5.8. Transfección**

Cada uno de los constructos fue usado para transfectar células HeLa en platos de 6 pozos a una densidad celular de 300.000 células/pozo, usando 10µl de SuperFect (QIAGEN) y 2µg de plásmido, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se transfectaron con el constructo que expresa la proteína GFP fusionada al 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4 (pGUD-D1, pGUD-D2 y pGUD-4, respectivamente), con el propósito de determinar si existen miRNAs celulares que reconocen la 3'UTR de cada uno de los tres serotipos de DENV evaluados; por ende, se observará una disminución en la expresión de GFP. Cuando el propósito fue evaluar si miR-484 y miR-744 reconocían la 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4, lo que se hizo fue co-transfectar células HeLa con los constructos pGUD-D1, pGUD-D2 y pGUD-4 en presencia de miR-744 o miR-484.

A las 24 horas pos-transfección, se verificó la eficiencia de la transfección por microscopía de fluorescencia y el efecto de los dos miRNAs sobre la expresión de GFP se determinó por Western Blot.

### **5.9. Infección de células HeLa con DENV-2**

Células Hela fueron sembradas en platos de seis pozos con una densidad de 300.000 células/pozo e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Veinticuatro horas después fueron lavadas con PBS e incubadas con 6.9x10<sup>5</sup> copias de RNA viral a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por tres horas en mínima agitación. Después de la infección, se removió el medio, se lavó las células y se adicionó medio DMEM suplementado con 4% SFB y se incubaron por 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

### **5.10. Western Blot**

Las células fueron desprendidas con tripsina y lisadas para la extracción de las proteínas totales, las cuales fueron cuantificadas usando el kit BCA Protein Assay (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. 30µg de proteínas totales se

cargaron en un gel SDS-PAGE y después de la migración, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Finalmente para la detección de la GFP, se usó el anticuerpo primario anti-GFP (Roche) en una dilución 1:3000 y como anticuerpo secundario un anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:2000. La replicación del virus se evaluó con base en la expresión de la proteína NS1 de DENV2, usando como anticuerpo primario anti-NS1 (ThermoScientific) a una dilución de 1:600. Como control de carga para el Western Blot se escanearon las membranas coloreadas con rojo Ponceau.

### **5.11. Efecto de los miR-744 y miR-484 en la replicación de DENV2**

Para determinar el efecto de los miR-744 y miR-484 en la replicación de DENV2 se siguió la siguiente estrategia: **i)** Células HeLa fueron transfectadas con cada uno de los miRNAs. Veinticuatro horas después de la transfección, se verificó la eficiencia de la transfección por microscopía de fluorescencia, e inmediatamente después las células fueron infectadas con DENV2, e incubadas por 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para efectos del presente trabajo, el efecto de los miRNAs sobre la replicación del DENV se evaluó a través del nivel de expresión de la proteína NS1 de DENV-2, detectada por Western blot.

**ii)** La segunda estrategia consistió en infectar primero las células HeLa con DENV2, tal como se describió anteriormente y veinticuatro horas después se transfectó con los miRNAs. Luego de 72 horas de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se evaluó el nivel de expresión de NS1, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Titulación viral

En la figura 7 se muestra los resultados obtenidos con cuatro diluciones de pD2/lc-Em. Al graficar el Ct vs. Log número de copias, se obtiene una línea recta con un  $r^2$  de 0.9925. El intercepto con el eje 'Y' de la regresión lineal fue 37.267Ct y la pendiente por cada cambio en un factor de diez en la concentración del plásmido fue de -3.591 (Figura 7A). La eficiencia de la amplificación fue del 89.9%, donde el 100% indica una exacta duplicación de la cadena de cDNA. Es de anotar que el Ct es inversamente proporcional a la concentración de RNA viral. Con base en este análisis, nuestro stock viral contiene  $6.9 \times 10^6$  copias de RNA viral/mL y para los ensayos de infección se usó  $6.9 \times 10^5$  copias de RNA viral. En la figura 7B se observa el fragmento amplificado de 625pb de cada una de las diluciones usadas para la titulación, que corresponde a la 3'UTR del genoma del DENV2.

### 6.2. El nivel de expresión de GFP es disminuido en células HeLa transfectadas con un constructo que expresa la GFP fusionada al 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4.

Resultados anteriores obtenidos *in vitro*, nos permitió hipotetizar que existen miRNAs celulares capaces de reconocer secuencias blanco en el 3'UTR de DENV2. El siguiente paso fue verificar si este mismo efecto es común en presencia de la 3'UTR de todos los serotipos de DENV. Con el propósito de recolectar evidencia que nos permita verificar nuestra hipótesis, lo primero que se hizo fue clonar la 3'UTR de DENV1, 2 y 4, en el vector pEGFP-C1 (3'UTR de DENV3 no fue posible clonar). Por tanto, al transfectar células HeLa con dichos constructos y si existen miRNAs que reconocen dicha región, habrá una disminución en el nivel de expresión de GFP, comparado con la expresión del control pEGFP-C1 sin 3'UTR. De acuerdo a lo esperado y tal como se observa en la figura 8, cuando GFP se expresa en presencia de la 3'UTR de los tres serotipos de DENV, hay una disminución en el nivel de expresión de GFP, comparado con el contenido de GFP del control, indicando que en efecto existen miRNAs celulares que reconocen el 3'UTR del genoma viral. Es de anotar que el efecto es más

evidente en presencia del 3'UTR de DENV-1 y DENV-2. Los ensayos se repitieron tres veces con resultados muy similares.

### **6.3. Los miR-744 y miR-484 regulan negativamente la expresión de GFP, que se expresa fusionada a la 3'UTR de DENV1, DENV2 y DENV4.**

Los ensayos de bioinformática permitieron predecir que en la 3'UTR de los 4 serotipos de DENV existían blancos para los miRNAs celulares miR-744 y miR-484. Con base en esa información se mandó a sintetizar esos dos miRNAs en una casa comercial y luego se usaron para determinar su efecto en la expresión de GFP que contiene la 3'UTR de DENV1, 2 y 4. Sin embargo vale la pena recalcar que esta estrategia utilizada tiene un problema, ya que el vector que expresa los dos miRNAs también expresa la GFP (ver materiales y métodos). Por tanto, los resultados obtenidos no van a ser muy concluyentes. La idea fue comparar el nivel de expresión de GFP-3'UTR en presencia o ausencia de los dos miRNAs de interés. Como se observa en la figura 9, cuando las células HeLa se transfectaron sólo con pGUD-D1, pGUD-D2 y pGUD-D4 o con los dos miRNA (miR-744 y miR-484) independientemente, se observa una fuerte expresión de GFP, al igual que cuando se transfectan cada uno de los pGUD y pmiR con sus controles, pEGFP-C1 y pmiR-SC respectivamente. Sin embargo, cuando los constructos pGUD-D1, pGUD-D2 y pGUD-D4 se expresaron en presencia de miR484, se observa una fuerte disminución de la expresión de GFP-3'UTR de DENV-4 y una reducción más leve para DENV-2 y DENV-1 (Figura 9). Pero si dichos constructos se expresan en presencia de miR-744, se observa una fuerte disminución en el contenido de GFP, cuando se expresa en presencia de la 3'UTR de DENV-1 (comparar la expresión de miR-744 solo y con pmiR-SC); para DENV-2 y DENV-4 igualmente tuvo un efecto, pero es menos marcado. Si bien estos resultados no permiten sacar una conclusión, porque los dos constructos expresan GFP, nos están sugiriendo que muy posiblemente tanto miR-484 como miR-744, reconocen secuencias presentes en 3'UTR de los serotipos 1, 2 y 4 de DENV.

#### **6.4. Los miR-484 y miR-744 afectan negativamente la replicación de DENV2.**

El conjunto de resultados expuestos anteriormente sugieren que existen miRNAs celulares, en particular miR-484 y miR-744, capaces de reconocer secuencias blanco en el 3'UTR de los tres serotipos de DENV evaluados, y por lo tanto podrían afectar negativamente la replicación y/o traducción del genoma viral. Para confirmar nuestra hipótesis, primero se transfectaron células HeLa con los constructos que generan los miRNAs y luego se infectaron con DENV-2 o, primero se infectaron y luego se transfectaron con los dos plásmidos que portan el gen que codifica por los dos miRNAs. Setenta y dos horas después se evaluó la replicación del DENV2, con base en el nivel de expresión de la proteína viral NS1. Como control positivo se usó sólo células HeLa infectadas solo con DENV2. Los resultados muestran que el nivel de expresión de la proteína viral NS1 disminuye en presencia de cada uno de los miRNAs (Figura 10), dependiendo de la estrategia utilizada. Cuando primero se transfectó con los constructos que originan los dos miRNAs y luego se infectó con el DENV2, no hubo detección de NS1 (Figura 10A), sugiriendo que la presencia de miR-744 y miR-484 bloquea la replicación del DENV, ya que en las células infectadas en ausencia de los dos miRNAs fue posible detectar NS1, lo que indica que el virus se replica normalmente. Cuando las células se infectaron primero y luego se transfectaron con los constructos que expresan los miRNAs, se observó lo siguiente: miR-484 bloquea casi el 100% la replicación del DENV2 (se detecta una ligera banda de NS1), pero en presencia de miR-744, el efecto fue menos drástico (la expresión de NS1 disminuye aproximadamente entre el 60 y el 70%) (Figura 10B). El conjunto de resultados obtenidos con la estrategia utilizada, indican que si existen miRNAs celulares que reconocen secuencias en la 3'UTR de DENV y afectan negativamente la replicación del DENV2, particularmente miR-484, el cual bloquea completamente el ciclo replicativo del DENV2. Con base en los resultados obtenidos, es de vital importancia evaluar el efecto de los dos miRNAs en la replicación de los otros tres serotipos DENV1, DENV3 y DENV4.

## 7. DISCUSIÓN

Los miRNAs constituyen uno de los principales mecanismos reguladores de la expresión génica a nivel postranscripcional y básicamente lo hacen interactuando con regiones no traducidas de los mRNA (Maziere y Enright, 2007; Nilsen, 2007). Si la homología del miRNA y el mRNA es completa (100%), generalmente resulta en la degradación del mRNA, mientras que si la homología es incompleta, el miRNA inhibe la síntesis de proteínas (Ambros, 2004).

No obstante, se ha reportado que pueden regular la invasión por virus, inhibiendo el ciclo replicativo viral; sin embargo, también pueden contribuir positivamente en la replicación de otros virus. Estas importantes características hacen que los miRNAs se constituyan en potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer y enfermedades infecciosas, ocasionadas por ejemplo, por virus. De hecho, Lanford *et al.* encontraron que el tratamiento de chimpancés infectados con el virus de la Hepatitis C (VHC) con oligonucleótidos complementarios al miR-122, puede conllevar a una supresión de la viremia del VHC. El miR-122 es altamente expresado en el hígado y puede unirse a la región 5'NCR (del inglés 5'noncoding region) del genoma de VHC, resultando en la regulación positiva del RNA viral (Jopling *et al.*, 2008). De los diferentes miRNAs descritos, miR-122 es de los pocos que interactúan con la 5'UTR y regulan positivamente la expresión de proteínas.

La mayoría de los sitios de unión para los miRNAs celulares han sido detectados en la región 3' no traducida o 3'UTR de los mRNA blanco (Griffiths-Jones *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2005). Esto ha conllevado a que esta región sea objeto de estudio debido a que en la mayoría de genomas virales, se caracteriza por tener complejas estructuras secundarias y generalmente participa activamente en el ciclo replicativo del virus.

En el caso del DENV, tanto la 5' como la 3'UTR, participan activamente en la regulación, traducción y en la replicación del genoma viral, y se caracterizan por ser altamente estructurada y conservada entre la mayoría de los integrantes del género *Flavivirus* (Men *et al.*, 1996; Weaver y Vasilakis, 2009). El dengue es una de las principales enfermedades de los países tropicales y subtropicales y es

considerada a nivel mundial, como una de las enfermedades más importantes transmitidas por mosquitos, ya que en los últimos años la incidencia del dengue se ha incrementado en una tasa alarmante; además, los casos severos de dengue pueden causar la muerte. Sin embargo, no se dispone ni de una vacuna, ni de un tratamiento adecuado para el control de la progresión de la enfermedad (Halstead, 2007). Por tal razón nuestros resultados son de vital importancia, ya que sugieren que existen miRNAs celulares que reconocen blancos en la 3'UTR del genoma del DENV y regulan negativamente la expresión de proteínas virales.

El conjunto de resultados presentados en este trabajo indican que la presencia en células HeLa de la 3'UTR de DENV-1, DENV-2 y DENV-4 clonada corriente abajo del gen que codifica por GFP, ejerce un efecto represor en la expresión del gen reportero GFP. Lo interesante de los resultados es que la represión de la expresión de GFP, es un efecto común en la presencia de la 3'UTR de los tres serotipos de DENV evaluados. Estos resultados sugieren que existen miRNAs generados por la misma célula hospedera, que reconocen secuencias blanco presentes en la 3'UTR y modulan la síntesis de GFP; este mismo comportamiento se podría observar en células infectadas afectando negativamente el ciclo replicativo del DENV.

De acuerdo con predicciones realizadas con el programa MicroInspector, un software de escaneo de secuencias blanco para la detección de sitios de unión de miRNAs, los miR-484 y miR-744 humanos podrían reconocer secuencias blanco en la 3'UTR de DENV. Lo interesante es que estos dos miRNAs reconocen secuencias que son comunes para los cuatro serotipos de DENV. Al hacer la transfección simultánea con cada uno de estos dos miRNAs y el constructo que expresa la GFP fusionada a la 3'UTR de DENV-1, DENV-2 y DENV-4, se observó una disminución en la expresión de GFP, sugiriendo que en efecto, esos dos miRNAs, reconocen la 3'UTR y afectan la expresión de la proteína de interés. Si bien el efecto no fue evidente para los tres serotipos de DENV evaluados, los resultados se pueden explicar por la estrategia utilizada (ver metodología y resultados). Como los dos constructos portan el gen que codifica por la GFP, es muy difícil poder concluir si existe o no un efecto. Sin embargo, teniendo en cuenta



que la ubicación de la secuencia blanco de los miRNAs en el 3'UTR, coincide con una secuencia altamente conservada conocida como 3'UAR (del inglés upstream of AUG región) y 3'CS (Figura 6), las cuales participan activamente en la circularización del genoma viral, es muy probable que esos miRNAs afecten este proceso, con consecuencias drásticas en la replicación viral.

Finalmente nuestros resultados muestran que en efecto, tanto miR-484 y miR-744 afectan drásticamente la replicación de DENV-2. La replicación, según la expresión de la proteína viral NS1, es totalmente bloqueada cuando los miRNAs son primero expresados en las células HeLa y luego infectadas. Pero si las células son primero infectadas, se observa un efecto parcial de los dos miRNAs en la replicación viral. Este último efecto es probablemente debido a que todos los genes del genoma viral ya se expresaron y muy posiblemente una proteína viral podría estar regulando negativamente la expresión de los dos miRNAs evaluados, conllevando a que la inhibición sea parcial.

Se ha demostrado que los miR-484 y miR-744 pueden ser expresados en diferentes tejidos humanos y dicha expresión puede ser regulada por diferentes factores externos que alteran la homeostasis celular, como son las enfermedades (Buratti et al., 2010; Dai et al., 2009; Estep et al., 2010; Hunter et al., 2008; Kitano et al., 2011). Sin embargo, a pesar de los diferentes estudios reportados sobre la expresión de estos dos miRNAs, hasta el momento no se le ha atribuido ninguna función específica, ni tampoco se conoce el mRNA blanco.

A pesar de que no se ha descrito miRNAs que regulen la replicación y/o traducción del DENV, recientemente se reportó que oligómeros antisentido conocidos como P-PMOs (del inglés peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers) han sido utilizados para inhibir la replicación del DENV y del virus del Nilo del oeste (WNV) (Deas et al., 2005; Kinney et al., 2005). Los P-PMOs son oligómeros análogos de DNA que tienen la capacidad de aparearse con secuencias blanco complementario, bloqueando el acceso de otras moléculas a secuencias específicas presentes en el RNA blanco. Igualmente se ha reportado que P-PMOs dirigidos contra secuencias blanco en la 3'UTR de DENV inhiben la replicación y traducción del virus, probablemente bloqueando por interferencia



estérica, las interacciones RNA-RNA o RNA-proteína implicadas en la traducción o síntesis del RNA viral (Holden et al., 2006). De igual manera se podría pensar que la interacción del RNA viral con el complejo RISC que contiene el miRNA maduro, podría evitar la circularización del genoma y afectar la replicación viral, siendo un mecanismo de control adicional a la regulación postranscripcional que normalmente ejercen los miRNAs. Probablemente esta interacción moduladora llevada a cabo por el miRNA, sea ejercida durante el reordenamiento de la estructura del 3'UTR del genoma viral para permitir a la secuencia 3'CS aparearse con su secuencia complementaria 5'CS como paso inicial para la síntesis de RNA viral de polaridad negativa, ya que es el único momento en el que el complejo RISC podría tener acceso a regiones como la 3'UAR descrita por Alvarez et al., (Alvarez et al., 2005b). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el efecto del miR-744 o miR-484 no sea sobre la circularización del genoma, sino mas bien que el reconocimiento de una secuencia blanco en la 3'UTR afecta la unión específica de proteínas celulares como PTB (del inglés Polypyrimidine tract binding) y EF-1 $\alpha$  (del inglés translation elongation factor-1  $\alpha$ ) (De Nova-Ocampo et al., 2002). Los autores sugieren que ambas proteínas funcionan como chaperonas para mantener la estructura del RNA en una conformación que favorezca la replicación viral y como helicasa del RNA viral, respectivamente.

Teniendo en cuenta que la replicación del genoma del DENV sólo se determinó con base en el nivel de expresión de la proteína NS1 y no mediante la replicación directa del virus mediante plaqueo por ejemplo, es necesario realizar otros estudios que permitan confirmar nuestros resultados. Igualmente la metodología utilizada no nos permite establecer si la regulación observada sucede a nivel de la transcripción o la traducción; aunque es bien conocido que los miRNAs actúan inhibiendo la traducción, recientes reportes indican que algunos miRNAs actúan impidiendo la expresión de su blanco a través del clivaje del mRNA (Yekta et al., 2004). Por tanto, para completar el estudio sería muy interesante cuantificar por PCR en tiempo real el nivel de expresión del RNA de DENV en presencia o ausencia de los dos miRNAs evaluados en este estudio.

En conclusión, el conjunto de resultados indican que existen secuencias en el 3'UTR de DENV que son reconocidas por los miR-484 y miR-744. El reconocimiento de dichas secuencias blanco por parte de los dos miRNAs, bloquea la replicación del DENV en células HeLa. Los resultados de este estudio son de vital importancia, ya que se podría pensar en una terapia basada en esos miRNAs, para el control de la infección y para el tratamiento del dengue.

## 8. REFERENCIAS

- Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV.** 2005a. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, 339:200-12.
- Alvarez DE, Filomatori CV, Gamarnik AV.** 2008. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology*, 375:223-35.
- Alvarez DE, Lodeiro MF, Luduena SJ, Pietrasanta LI, Gamarnik AV.** 2005b. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol*, 79:6631-43.
- Ambros V.** 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431:350-5.
- Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, de Lamballerie X, Gould EA, Grard G, Grimes JM, Hilgenfeld R, Jansson AM, Malet H, Mancini EJ, Mastrangelo E, Mattevi A, Milani M, Moureau G, Neyts J, Owens RJ, Ren J, Selisko B, Speroni S, Steuber H, Stuart DI, Unge T, Bolognesi M.** 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res*, 87:125-48.
- Buratti E, De Conti L, Stuani C, Romano M, Baralle M, Baralle F.** 2010. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS J*, 277:2268-81.
- Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, Putnak JR, Ivy JM, McDonell M, Bignami GS, Peters ID, Leung J, Weeks-Levy C, Nakano ET, Humphreys T.** 2010. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine*, 28:2705-15.
- Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R.** 2005. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol*, 79:853-9.
- Cologna R, Rico-Hesse R.** 2003. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*, 77:3929-38.
- Cullen BR.** 2006. Viruses and microRNAs. *Nat Genet*, 38 Suppl:S25-30.
- Chakravarti A, Kumaria R.** 2006. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res*, 123:25-30.

- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM.** 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 44:649-88.
- Choy EY, Siu KL, Kok KH, Lung RW, Tsang CM, To KF, Kwong DL, Tsao SW, Jin DY.** 2008. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med*, 205:2551-60.
- Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y.** 2009. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int*, 29:749-54.
- De Nova-Ocampo M, Villegas-Sepulveda N, del Angel RM.** 2002. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology*, 295:337-47.
- Deas TS, Binduga-Gajewska I, Tilgner M, Ren P, Stein DA, Moulton HM, Iversen PL, Kauffman EB, Kramer LD, Shi PY.** 2005. Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication. *J Virol*, 79:4599-609.
- Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D, Kanesa-Thanan N, Vaughn DW, Innis BL, Sun W.** 2003. Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg*, 69:48-60.
- Estep M, Armistead D, Hossain N, Elarainy H, Goodman Z, Baranova A, Chandhoke V, Younossi ZM.** 2010. Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 32:487-97.
- Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV.** 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev*, 20:2238-49.
- Ghosh Z, Mallick B, Chakrabarti J.** 2009. Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction. *Nucleic Acids Res*, 37:1035-48.
- Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ.** 2007. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:9422-7.
- Grassmann R, Jeang KT.** 2008. The roles of microRNAs in mammalian virus infection. *Biochim Biophys Acta*, 1779:706-11.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ.** 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36:D154-8.

- Gubler DJ.** 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*, 10:100-3.
- Guy B, Almond JW.** 2008. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 31:239-52.
- Guzman MG, Kouri G.** 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*, 2:33-42.
- Guzman MG, Kouri G.** 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*, 27:1-13.
- Guzman MG, Kouri G.** 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis*, 8:69-80.
- Halstead SB.** 2007. Dengue. *Lancet*, 370:1644-52.
- He L, Hannon GJ.** 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5:522-31.
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M.** 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, 27:3300-10.
- Holden KL, Stein DA, Pierson TC, Ahmed AA, Clyde K, Iversen PL, Harris E.** 2006. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology*, 344:439-52.
- Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H.** 2007. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med*, 13:1241-7.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB.** 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 3:e3694.
- Jopling CL, Schutz S, Sarnow P.** 2008. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*, 4:77-85.
- Kinney RM, Huang CY, Rose BC, Kroeker AD, Dreher TW, Iversen PL, Stein DA.** 2005. Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers. *J Virol*, 79:5116-28.

- Kitano M, Rahbari R, Patterson EE, Xiong Y, Prasad NB, Wang Y, Zeiger MA, Kebebew E.** 2011. Expression Profiling of Difficult-to-diagnose Thyroid Histologic Subtypes Shows Distinct Expression Profiles and Identify Candidate Diagnostic microRNAs. *Ann Surg Oncol*,
- Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, Mason PW.** 2000. A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine*, 18:1133-9.
- Kurane I.** 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30:329-40.
- Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O.** 2005. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 308:557-60.
- Lee TC, Lin YL, Liao JT, Su CM, Lin CC, Lin WP, Liao CL.** 2010. Utilizing liver-specific microRNA-122 to modulate replication of dengue virus replicon. *Biochem Biophys Res Commun*, 396:596-601.
- Lescar J, Luo D, Xu T, Sampath A, Lim SP, Canard B, Vasudevan SG.** 2008. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res*, 80:94-101.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP.** 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120:15-20.
- Maziere P, Enright AJ.** 2007. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today*, 12:452-8.
- McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H.** 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect*, 2:1041-50.
- Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ.** 1996. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol*, 70:3930-7.
- Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S.** 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog*, 4:e17.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG.** 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 3:13-22.

- Murthy HM, Clum S, Padmanabhan R.** 1999. Dengue virus NS3 serine protease. Crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. *J Biol Chem*, 274:5573-80.
- Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY, Lin YS, Le BL, Huang KJ, Lin CF, Do QH, Vu TQ, Lam TM, Yeh TM, Huang JH, Liu CC, Halstead SB.** 2005. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 72:370-4.
- Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, Ha MT, Vo VT, Cao TP, Tran VD, Oyama T, Morita K, Yasunami M, Hirayama K.** 2008. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*, 2:e304.
- Nilsen TW.** 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*, 23:243-9.
- Noble CG, Chen YL, Dong H, Gu F, Lim SP, Schul W, Wang QY, Shi PY.** 2010. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral Res*, 85:450-62.
- OPS.** 2009. Actualización: PROGRAMA REGIONAL DENGUE. Informe.
- Perera R, Kuhn RJ.** 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 11:369-77.
- Qi P, Han JX, Lu YQ, Wang C, Bu FF.** 2006. Virus-encoded microRNAs: future therapeutic targets? *Cell Mol Immunol*, 3:411-9.
- Rajapakse S.** 2009. Corticosteroids in the treatment of dengue illness. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103:122-6.
- Restrepo BN, Ramirez RE, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ.** 2008. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*, 79:673-7.
- Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV.** 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 352:971-7.
- Sachs LA, Schnurr D, Yagi S, Lachowicz-Scroggins ME, Widdicombe JH.** 2011. Quantitative real-time PCR for rhinovirus, and its use in determining



the relationship between TCID50 and the number of viral particles. *J Virol Methods*, 171:212-8.

**Scaria V, Hariharan M, Pillai B, Maiti S, Brahmachari SK.** 2007. Host-virus genome interactions: macro roles for microRNAs. *Cell Microbiol*, 9:2784-94.

**Seto AG.** 2010. The road toward microRNA therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol*, 42:1298-305.

**Stanley WM.** 1950. *Recent advances in virus research*. Washington,.

**Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA.** 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*, 197:823-9.

**Taylor EL, Gant TW.** 2008. Emerging fundamental roles for non-coding RNA species in toxicology. *Toxicology*, 246:34-9.

**Urcuqui-Inchima S, Patino C, Torres S, Haenni AL, Diaz FJ.** 2010. Recent developments in understanding dengue virus replication. *Adv Virus Res*, 77:1-39.

**Villordo SM, Gamarnik AV.** 2009. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res*, 139:230-9.

**Weaver SC, Vasilakis N.** 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*, 9:523-40.

**Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S.** 2009. Progress towards a dengue vaccine. *Lancet Infect Dis*, 9:678-87.

**WHO.** 2009. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.

**WHO.** 2010. *Impact of Dengue* <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>>.

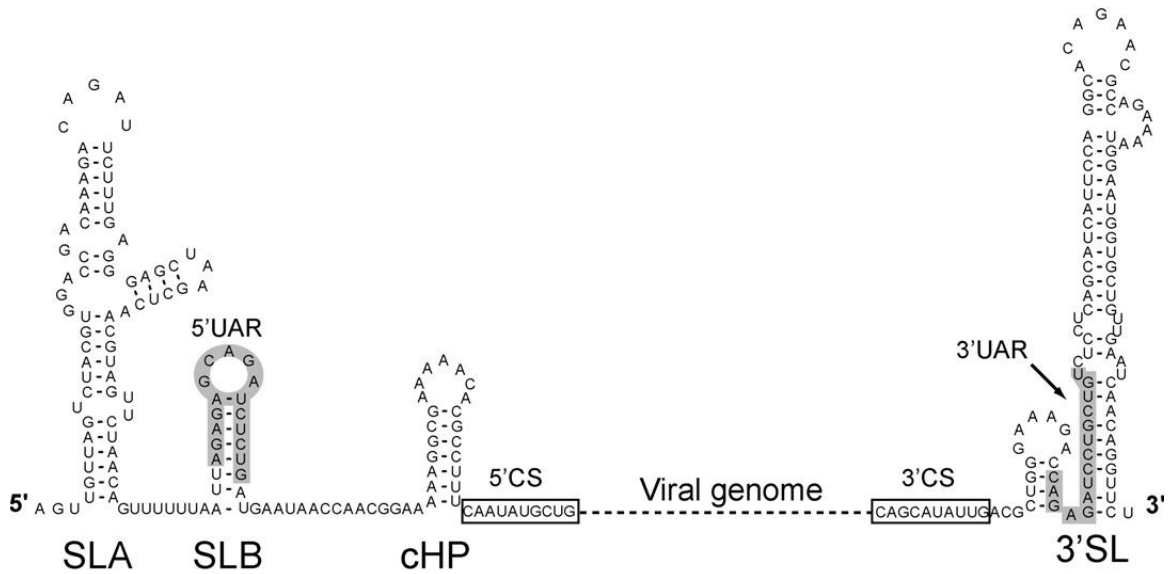
**Wilder-Smith A, Gubler DJ.** 2008. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am*, 92:1377-90, x.

**Yekta S, Shih IH, Bartel DP.** 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 304:594-6.

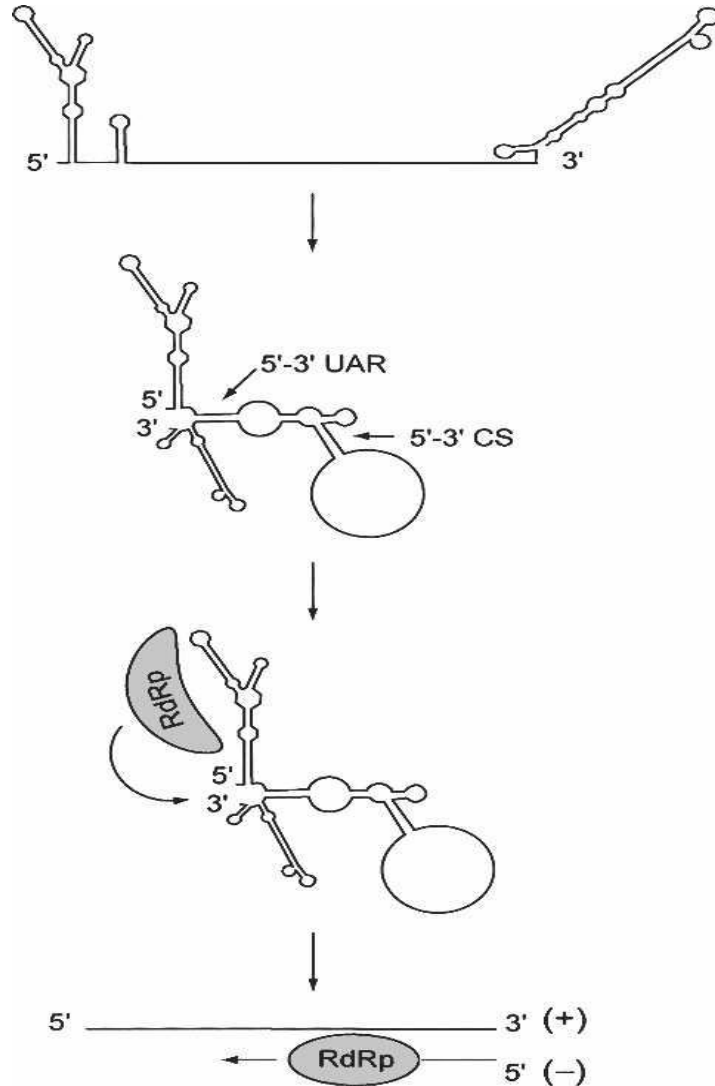


**Yu L, Nomaguchi M, Padmanabhan R, Markoff L.** 2008. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology*, 374:170-85.

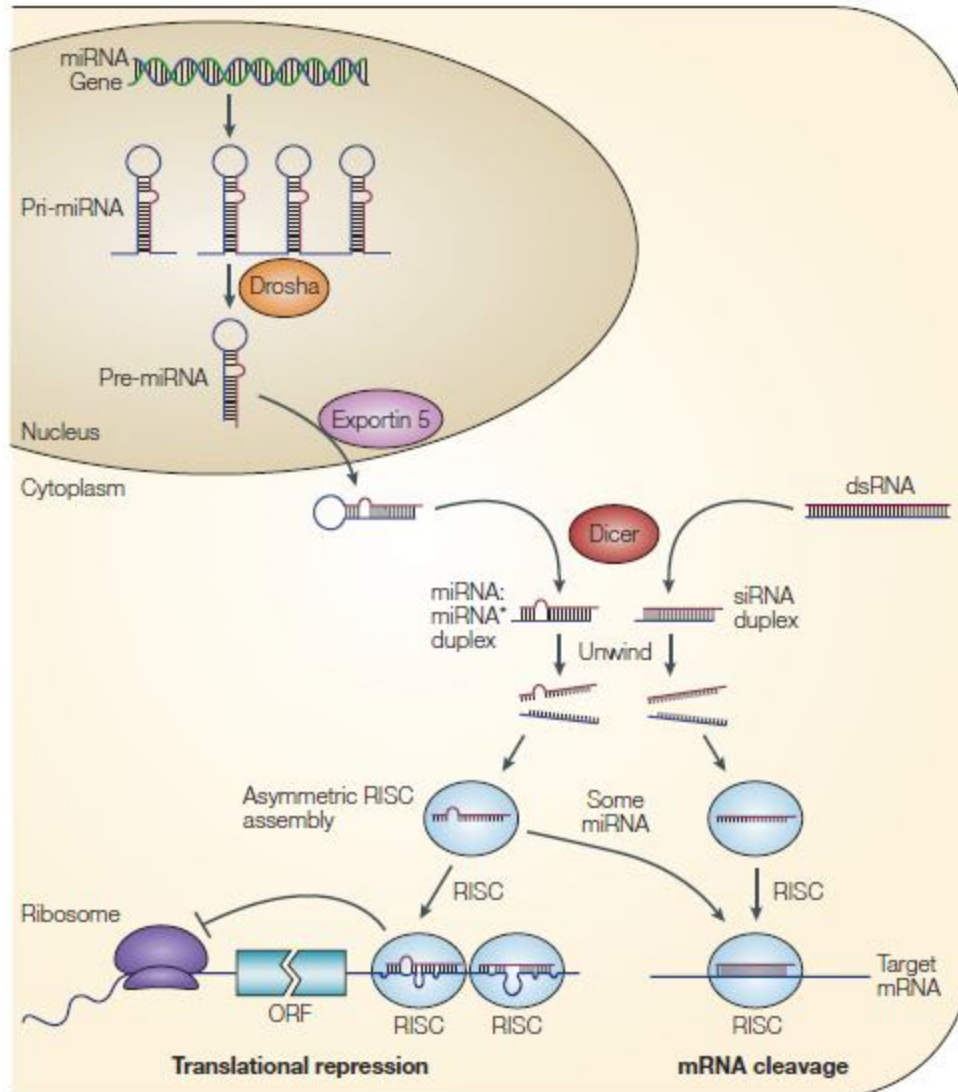
## 9. FIGURAS



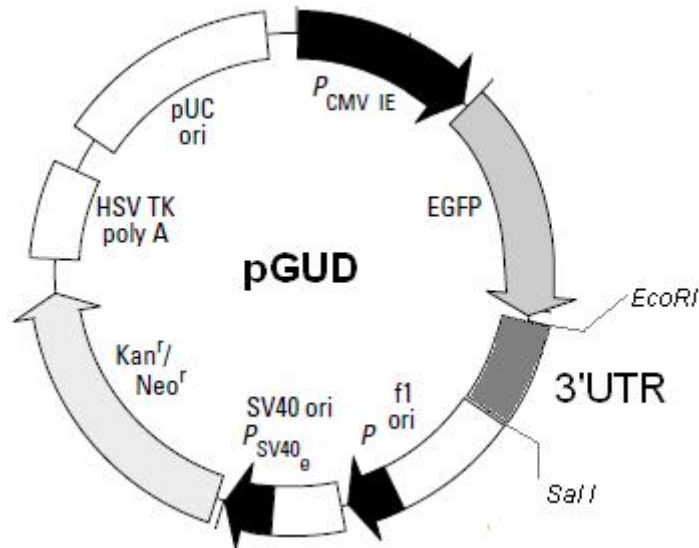
**Figura 1.** Estructura secundaria de los extremos no codificantes 5' y 3' (5' y 3'UTR) del genoma de DENV2. Tomado de Villordo y Gamarnik, 2009.



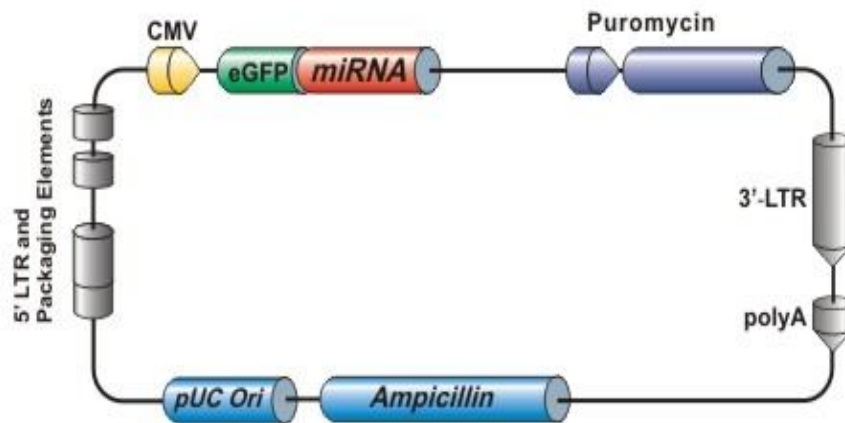
**Figura 2.** Representación esquemática de la replicación del genoma del DENV. La complementariedad de las secuencias conservadas localizadas en 5'–3'UTR (UAR y CS) permiten la circularización del genoma viral, haciendo que la RdRp viral (NS5) interactúe con 5'SLA y acceda así al extremo 3' e inicie la síntesis de el RNA de polaridad negativa, el cual a la vez sirve de molde para la síntesis del RNA<sup>(+)</sup> que va ser encapsidado. Tomado de Filomatori et al., 2006



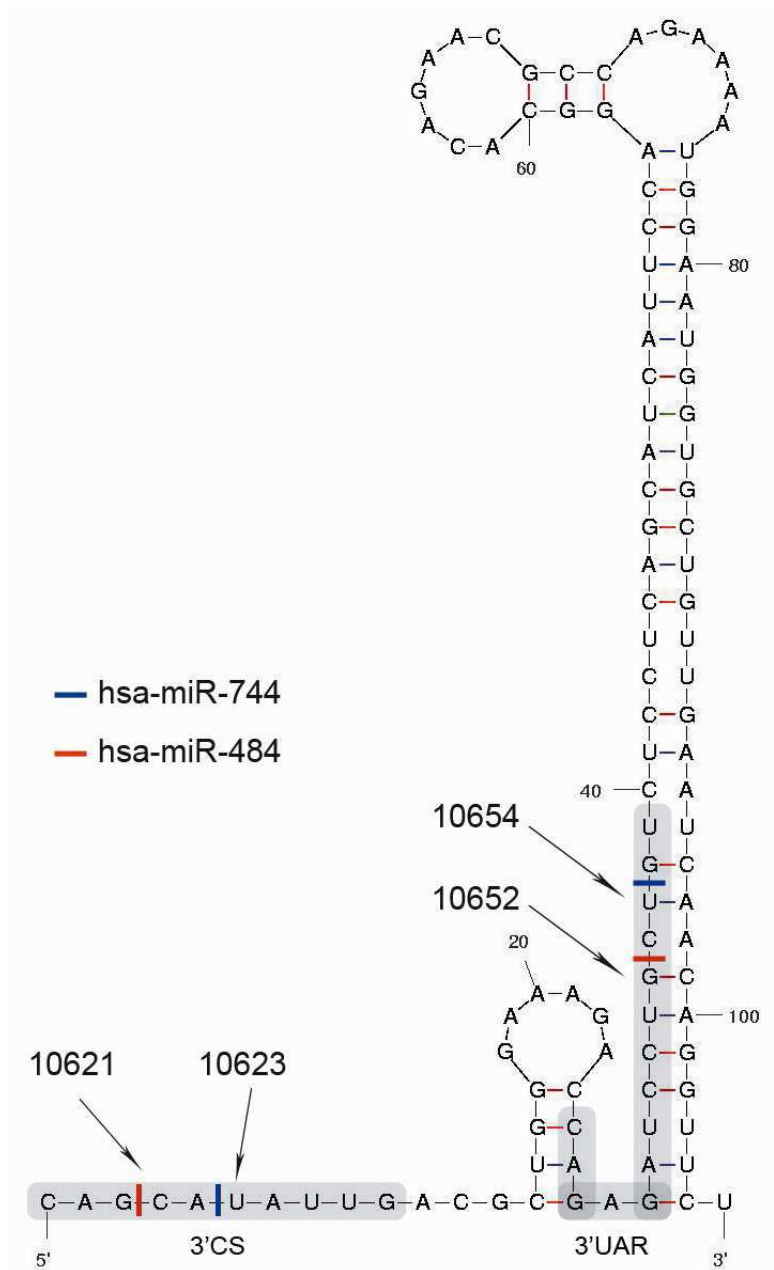
**Figura 3.** Modelo actual de la biogénesis y represión pos-transcripcional de los miRNAs. Tomado de He y Hannon, 2004.



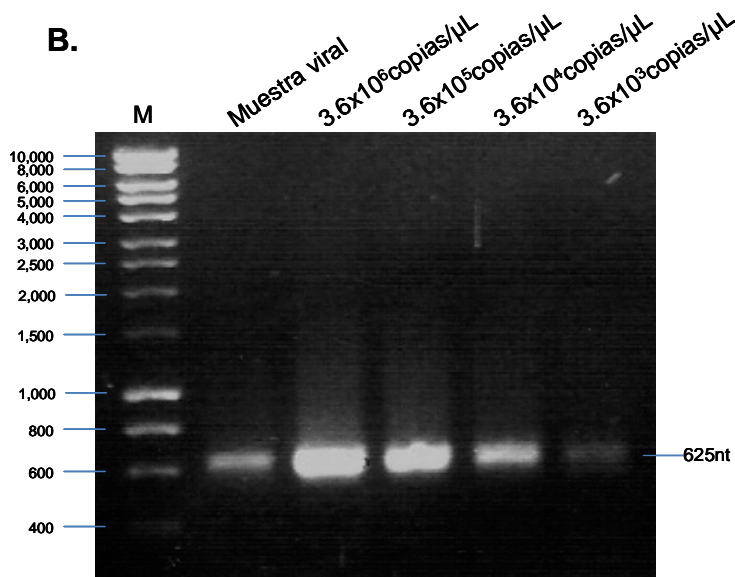
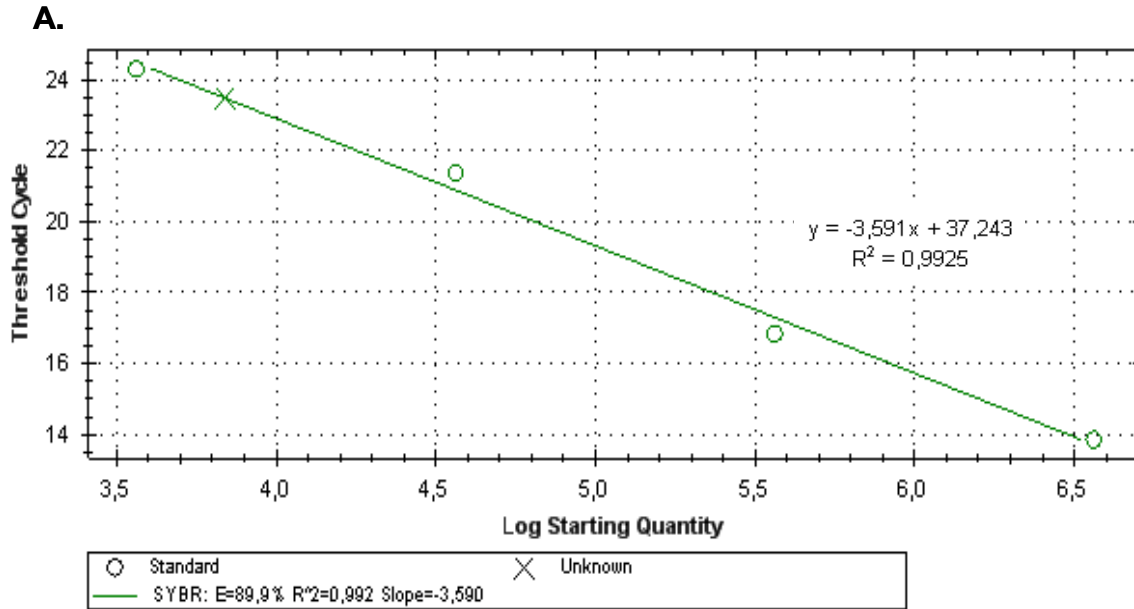
**Figura 4.** Esquema del plásmido pGUD. La 3'UTR del genoma del DENV1, 2 y 4, fue clonada en el sitio múltiple de clonación con las enzimas *EcoRI* y *Sal I*. La expresión del plásmido permite obtener el mRNA de GFP fusionado al 3'UTR. La transcripción del gen que codifica por la GFP está dirigida por el promotor de un gen muy temprano de CMV. Además el plásmido contiene el gen de resistencia a kanamicina, lo que permite la selección de colonias bacterianas transformadas.



**Figura 5.** Esquema del vector que contiene el precursor de los miR-484 y miR-744. Como se puede apreciar, el gen que codifica para los dos miRNAs se encuentra corriente arriba del gen que codifica por la GFP. El vector contiene además el gen de resistencia a la ampicilina.

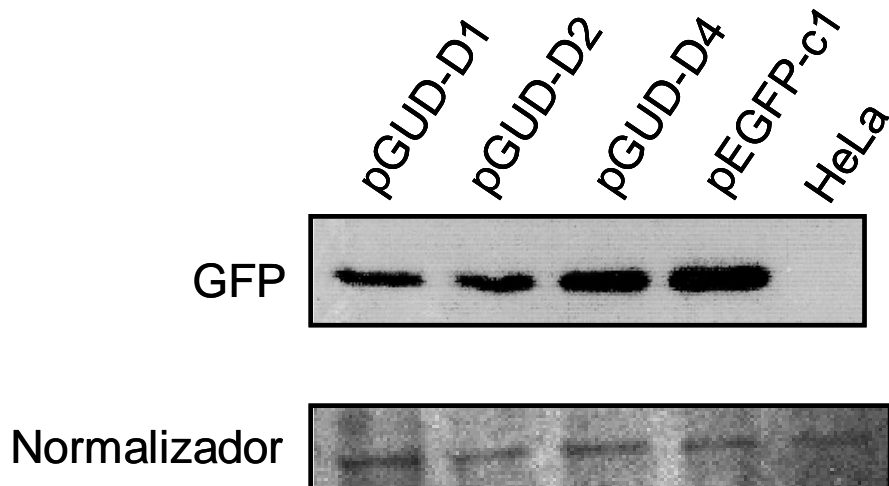


**Figura 6.** Localización de los blancos de los miR-484 y miR-744 en la región 3'SL del DENV2. Las líneas de colores flanquean la secuencia blanco de cada miRNA: miR-484 cubre las posiciones 10621 a 10652 y miR-744 las posiciones 10623 a 10654 de la 3'UTR. En la figura se muestra claramente que el blanco de los dos miRNAs incluye las secuencias conservadas 3'CS y 3'UAR, ambas implicadas en la replicación del genoma del DENV. Dichas secuencias son conservadas en el genoma de los 4 serotipos de DENV.

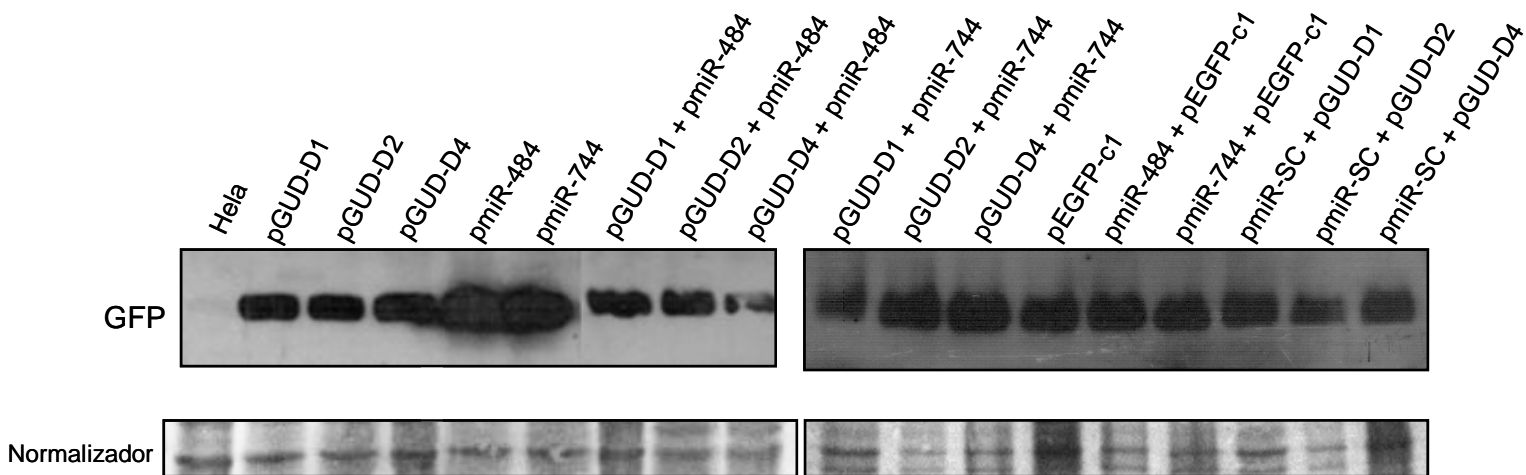


**Figura 7.** Titulación de DENV2. **A.** Para la titulación del stock viral usado en el presente estudio se emplearon cuatro diluciones (círculos) diferentes del pD2/Ic-Em ( $3.6 \times 10^6$ ,  $3.6 \times 10^5$ ,  $3.6 \times 10^4$  y  $3.6 \times 10^3$  copias/ $\mu$ L). La X representa la concentración del RNA viral contenida en el stock ( $6.9 \times 10^6$  copias de RNA viral/mL). **B.** Amplificación del fragmento de 625nt tanto de las diluciones como del stock viral, que corresponde a la 3'UTR de DENV2.

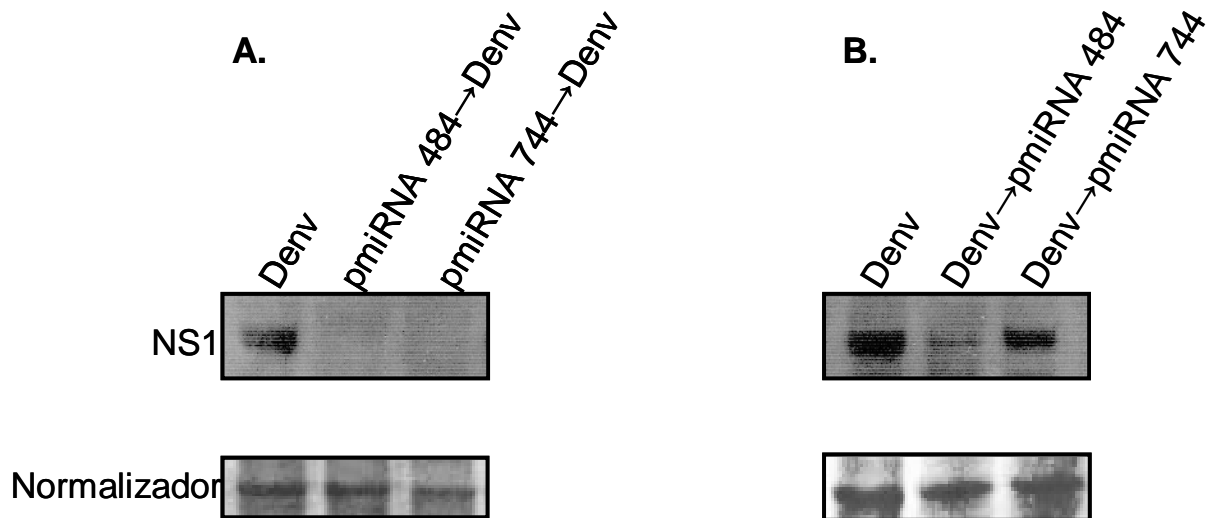




**Figura 8.** La presencia de la 3'UTR corriente abajo del gen que codifica por la GFP, afecta la expresión de GFP. Células HeLa se transfectaron con un constructo que expresa la GFP fusionada a la 3'UTR de DENV1 (pGUD-D1), DENV2 (pGUD-D2) y DENV4 (pGUD-D4). Veinticuatro horas después se hizo un lisado celular y finalmente el nivel de expresión de GFP se determinó por Western Blot. Como control de carga se usó la membrana coloreada con rojo Ponceau.



**Figura 9.** Expresión de GFP en células HeLa cotransfectadas con cada uno de los plásmidos que contienen las 3'UTR de DENV1, DENV2 Y DENV4 y los miRNA-484 y miRNA-744. Como control de carga se usó la membrana coloreada con rojo Ponceau.



**Figura 10.** miR-484 y miR-744 bloquean la replicación de DENV2. Se detectó la expresión de la proteína NS1 del DENV2 en células HeLa que han sido primero transfectadas con los miR-484 y miR-744, y luego infectadas con DENV2 (**A**); y células que han sido infectadas y posteriormente transfectadas con los miR-484 y miR-744 (**B**). Como control de carga se usó la membrana coloreada con rojo Ponceau.