



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BACH1 Y SU EFECTO EN LA REPLICACIÓN
DEL VIRUS DEL DENGUE”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

Daniel Gutiérrez Cervantes

Tutora: Dra. Martha Yocupicio Monroy

2016

Los Reyes Iztacala, Edo. de México





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

a la

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

a la Facultad de Biología

FES Iztacala

Muchas gracias a mi directora de tesis

Dra. Martha Eugenia Yocupicio Monroy...

por su paciencia, tiempo, dedicación, apoyo, ejemplo, comprensión
y su consejo, que fueron determinantes para concluir este trabajo.

A

TODOS MIS MAESTROS

a mis sinodales

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dr. Luis Enrique Arias Romero

Dr. Ignacio Terrazas Valdéz

Dr. Ismael Herminio Pérez Hernández

A MIS PADRES

Por todo el apoyo que me dieron en la vida y enseñarme que hay que seguirle.....José Francisco y María de Jesús

A mi novia Karen Juárez.

GRACIAS A MIS AMIGOS: Toda la flota UACMita: Dr. Mauricio, Dra. Olguita, Dra. Edén, Rulo, Rubi, Ali, Helios, Jackie, Jose Luis, Helios, Brothi, David, Andrés, Bere, Katy, Lulú, Wendy, Kenji, Naye, Ceci, Hugo, Almita, Laura, Yonas, La Coope, el comedor, Dr. Recillas, A fisiología Celular, Rodrigo, Paco, Edgar, Erandi, Chayo, Dr. Christian Váldez por todos los rides a mi casa.... Christian FES Iztacala, Maestro Luis Antonio del laboratorio de microbiología, Didier, Iván, Miss Deni por no dejar morir el Rock de fina calidad, Lalo Sasquash por tu afición por la Biología, Stentor Cliff, Carpita, Fabián y David de mi equipo de laboratorio, Profesor Stanford, Profesor Tejero, Profesor Rocha, Profesor Rafael de Ecología, Señorita Ema de ventanillas, Prof. De Chino Daniel Blas, Aguifil!, Arthur, sigan haciendo el rock algo real, Rock Dreams, Gabo, Hector, Alain, Fernando, Sarah, Cone, Charlie, y Polo Marín, por apoyarme con la chamba todo el tiempo que estuve UNAMEANDO, Gil Brujo, Bryan y REBIRTH OF PAIN Mink, Baldo Y Filius, Uriel, APU, Profesor Antonio de fisicoquímica, Daniel y Fabián de la clase de Biología Celular, Al taquero de canasta de CU donde siempre comía, Profe Gerse de Cálculo Integral y evolución (inigualable pensamiento), Julieta Orozco de jefatura, Vilchis, Verde, Félix, Samo, Chais, Ulises Thrasher, Dra. Paty Ramos y Hugo del Banco de moscas del Departamento de Genética Toxicológica, profes Mario, Héctor y Hugo Morfofisiología Animal, profe Omar del Acuario, Yumara y Netro de mi Equipo de Diversidad, Karlita, Verde, Richi, Marco y Mike, Moctezuma, y a quienes me faltaron..... por hacer este mundo un lugar habitable en donde existir.....

Este trabajo de Tesis se realizó gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y el financiamiento del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CONACyT-60282)

INDICE

Abreviaturas.....	i
Resumen.....	iii
Introducción.....	1
Objetivo General y Particulares.....	18
Hipótesis.....	19
Estrategia experimental.....	20
Importancia del Estudio.....	21
Materiales y Método.....	22
Resultados.....	28
Discusión.....	37
Conclusión.....	40
Referencias.....	-1-

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1.....	2
Fig. 2.....	4
Fig. 3.....	6
Fig. 4.....	8
Fig. 5.....	9
Fig. 6.....	10
Fig. 7.....	11
Fig. 8.....	12
Fig. 9.....	13
Fig. 10.....	14
Fig. 11.....	15
Fig. 12.....	30
Fig. 13.....	32
Fig. 14.....	34
Fig. 15.....	36
Tabla 1.....	25

ABREVIATURAS

ARE	Elementos de respuesta antioxidante
C	Cápside
Chp	Hairpin
CO	Monóxido de carbono
CS2	Secuencia ciclizada
CS	Secuencia complementaria
DAR	Región AUG rio abajo
DC	Células dendríticas
DENV	Virus del Dengue
E	Proteína de la Envoltura
ECM	Matriz extracelular
HRP	Peroxidasa del rábano
IFN	Interferón
IRES	Sitio de internalización al ribosoma
MEFs	Fibroblastos embrionicos de ratón
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
NC	Nucleocápside
NK	Células asesinas (linfocitos)
NKT	Linfocitos T células asesinas naturales
NOX	NAPDH oxidasa
NS	Proteína no estructural

MAPK	Cinasas de MAP
MMPs	Metaloproteinasas
NS3pro NS2A NS2B NS3 NS4A NS4B NS5	Proteína no estructural 3 Proteína no estructural 2A Proteína no estructural 2B Proteína no estructural 3 Proteína no estructural 4A Proteína no estructural 4B Proteína no estructural 5
nts	Nucleótidos
prM	Precursor membranal
PTP	Proteínas fosfatasas de tirosina
PTK	Cinasas de tirosina
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Tallo
SL	Horquilla de RNA
SLA	Horquilla de RNA A
SLB	Horquilla de RNA B
SSL	Horquilla deslizante
T.A.	Temperatura ambiente
TIMP	Tejido inhibidor de metaloproteinasas de la matriz
TL	Horquilla Top
TLRs	Receptores tipo Toll
UTR	Región no traducida
VR	Región variable

RESUMEN

La infección por el DENV o comúnmente conocido como “Dengue” requiere de la interacción de las estructuras virales con moléculas celulares del huésped infectado; todo este proceso modifica el balance biológico que existe en la célula. La activación de los programas antivirales de la célula huésped ha sido relacionado con el estrés oxidativo en las células infectadas con virus del DENV. Los miRNAs efectúan una importante respuesta contra la infección por DENV; Anteriormente nuestro grupo de trabajo realizó un estudio de los miRNAs que están expresados cuando las células Huh-7 están infectadas con DENV, resultando ser *let-7c* el miRNA con los más altos niveles de expresión. BACH1 es un factor de transcripción que regula negativamente una gran cantidad de genes que participan en la respuesta a estrés oxidativo y es reprimido por la vía del microRNA *let7* modulada por la infección por DENV. En este estudio se evalúa el impacto que tiene la inhibición de BACH1 mediante siRNAs específicos, en células infectadas por DENV4 en células de hepatoma celular Huh-7. Las células fueron lipotransfectadas por 72 h. La inhibición del RNAm de BACH1 se correlacionó con una disminución de la replicación del DENV. Adicionalmente con las mismas condiciones, se evaluó la respuesta de HO-1 mediante PCR, que es una molécula que BACH1 normalmente reprime transcripcionalmente. La expresión de HO-1 se ve aumentada lo que sugiere que BACH1 es un importante modulador del estrés oxidativo en la infección por DENV.

INTRODUCCIÓN

El dengue como se le conoce comúnmente, es causado por el virus del dengue (DENV), que es un miembro de la familia de virus *Flaviviridae*. Existen 4 serotipos llamados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Navarro *et al.*, 2005; Rothman *et al.*, 2004) y sus principales vectores son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Qi Rui-Feng., *et al.*, 2008).

El DENV posee un genoma de RNA monocatenario y de polaridad positiva de aproximadamente 10.7 kb que codifica para una poliproteína cuyo material genético esta empaquetado en una cápside, rodeada a su vez, por una bicapa lipídica proveniente del huésped. El extremo 5' del genoma tiene un cap tipo I, y el extremo 3' carece de cola de poli-A. El genoma del DENV contiene genes que codifican para tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C), la proteína precursora de membrana (prM) y la proteína de la envoltura (E); el genoma restante codifica para 7 proteínas no estructurales (NS) que son esenciales para la replicación del virus (Fig. 1) (Qi Rui-feng *et al.*, 2008).

Para que el DENV infecte a su célula huésped, se requiere la interacción del virus con los receptores celulares, principalmente ICAM y DC-SIGN, por los cuales los virus son endocitados (Clyde *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005). En este lapso ocurren cambios conformacionales en la glicoproteína E, debido a la acidificación de las vesículas endosomales que promueven su trimerización, este fenómeno da lugar a la fusión de las membranas virales y endosomales (Qi Rui-feng *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2006; Alcaraz *et al.*, 2010). Después de la fusión, la nucleocápside (NC) es liberada al citoplasma, y promueve la disociación de la proteína C del RNA.

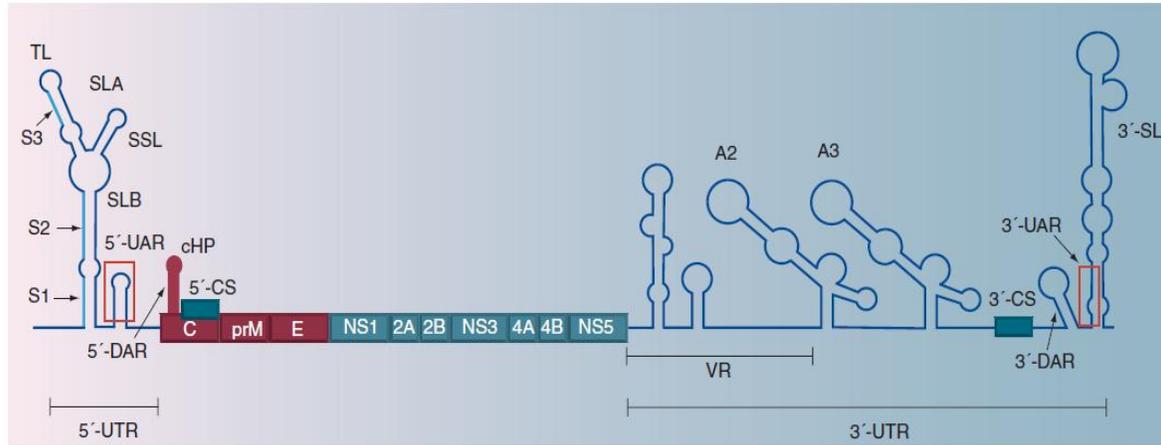


Fig. 1. RNA genómico de DENV. Los elementos Cis, juegan un papel esencial en el proceso de la replicación viral. En extremo 5' está localizada una estructura conservada conocida como horquilla A o SLA. La siguiente estructura es SLB, que contiene la UAR-5' y la región codificante C, luego están la estructura hairpin cHP y la CS-5'. En la región 3' UTR, la VR y las estructuras Y, referidas como A2 y A3, contienen secuencias conservadas llamadas RCS2 y CS2 respectivamente, la 3'-CS, la secuencia complementaria a 5'-DAR, llamadas 3'-DAR y la región conservada 3'SL que contiene a la región 'UAR. C: Cápside, CS: Secuencia ciclizada; DAR: Región AUG río abajo; E: Envoltura; prM: Precursor de la membrana; S:Tallo; SL: Horquilla del tallo; SLA: Horquilla del tallo A; SLB: Horquilla del tallo B; SSL: Horquilla deslizante del tallo; TL: horquilla superior; UAR: Región AUG río arriba; UTR: Región no traducida; VR: Región variable (Alcaraz *et al.*, 2010)

Una vez liberado el RNA en el citoplasma se inicia el proceso de traducción y posteriormente se procesa la poliproteína viral por las proteasas del huésped (señalasa y furina) (Qi *et al.*, 2008).

La replicación del genoma viral se realiza en membranas, guiada por la proteasa viral NS3pro, dando lugar a la partícula viral envuelta y a las proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5), la mayoría de estas proteínas junto con algunas proteínas del huésped son requeridas para formar la maquinaria de replicación en el citoplasma de las células infectadas. En la superficie del RE se ensamblan y forman las partículas virales, aquí es cuando las proteínas estructurales y el RNA sintetizado emergen al lumen del RE (Qi *et al.*, 2008). El virus que resulta es inmaduro y se procesa por la furina y proteasas tipo subtilisinas resultando en partículas maduras e infecciosas (Navarro *et al.*, 2005).

Las células dendríticas, NK y NKT, forman parte importante en el control temprano de la infección causada por dengue ya que generan una respuesta inmune de tipo Th1.

La cascada inflamatoria y defensa antiviral que genera la respuesta innata incluye una serie de moléculas como las citocinas secretadas por las células activadas (Fig. 2).

Las células dendríticas por medio de los receptores tipo Toll son las principales responsables de la producción de IFN I que estimula la transcripción de una gran cantidad de genes con actividad antiviral (Navarro *et al.*, 2005). Los receptores tipo Toll o TLRs representan una ruta común para iniciar la respuesta ante la infección vía células dendríticas

o células dendríticas y éstos juegan un papel importante en la liberación de citocinas que forman parte importante de la patogenicidad viral (Navarro *et al.*, 2005).

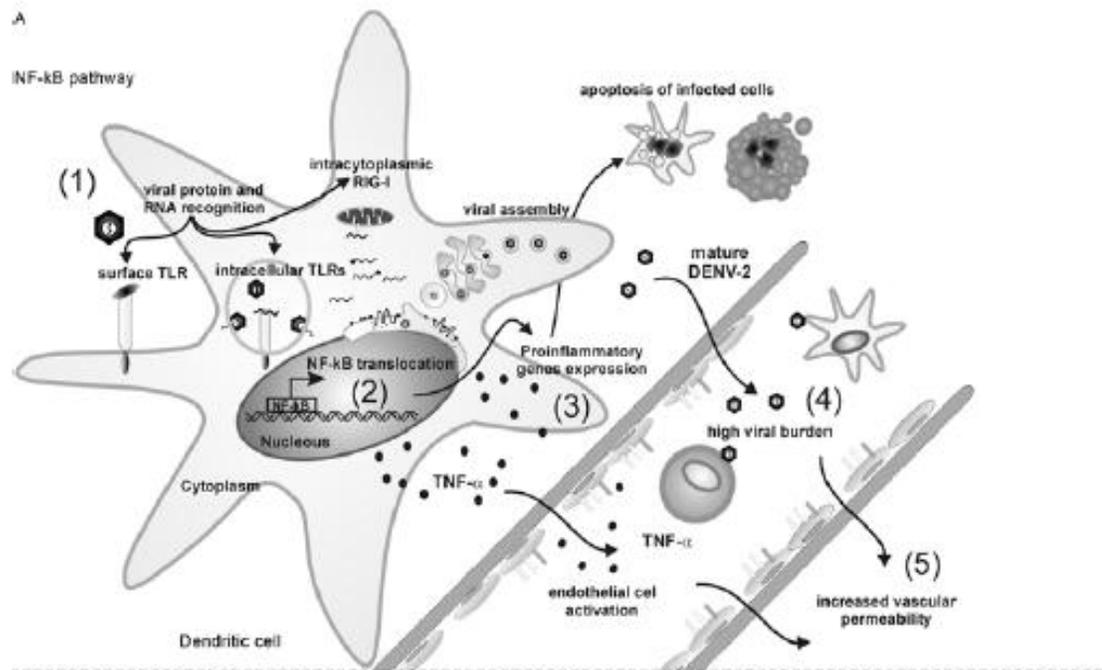


Fig. 2. Modelo teórico para interacción de células dendríticas-flavivirus.

Durante la infección de la célula hospedera, el virus del dengue (DENV) se detecta por los receptores de reconocimiento de patrones (1), lo que provoca la expresión de genes pro-inflamatorios tales como el factor nuclear kappa B (NF-kB) (2), resultando en la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) - α (3), mientras que el interferón β (IFN- β) es parcialmente inhibido por las proteínas DENV, tales como NS4, a través de la vía de STAT (4). La infección por DENV es el resultado de una carga viral alta (5), seguido de un incremento de la activación de genes pro-inflamatorios y la inducción de la pérdida de plasma (6) (Gandini *et al.*, 2011).

La respuesta del sistema inmune del huésped en contra de la infección por DENV no sólo media la protección en contra de la enfermedad, sino que también contribuye a disponer de la homeostasis celular, por ejemplo, grandes cantidades de citocinas como IL1B o TNF- α pueden empeorar la salud de los pacientes que contraen DENV (Olagnier *et al.*, 2014).

La activación de los programas anti-inflamatorios y antivirales ha sido relacionada con la producción de especies reactivas a oxígeno o ROS, que incluyen iones y peróxidos que son subproductos antioxidantes y tienen capacidad de reactividad química muy alta, por esta razón las células poseen mecanismos “scavenger” que mantienen la homeostasis reductiva. ROS y por consiguiente la modificación oxidativa y electrofílica de la cisteína 151 y/o la fosforilación de la cinasa C, o de la serina 40 de Keap1 resulta en la disociación de NRF2 y dicha proteína que a su vez se une a los elementos de respuesta antioxidante en los promotores de genes que codifican enzimas antioxidantes y desintoxicantes Fig. 3 (Kaspar *et al.*, 2009).

En la familia flaviviridae, el virus de la hepatitis C (HCV), promueve el estrés oxidativo y manipula los sistemas antioxidantes; el DENV por su parte, estimula el estrés oxidativo en hepatocitos e incrementa la cantidad de citocinas inflamatorias, lo que dispara una respuesta de tipo NADPH-oxidasa (NOX), requerida para la respuesta antiviral dirigida a apoptosis IRF3/7STAT y NF-KB (Olagnier *et al.*, 2014). Por otro lado la proteína represora de la transcripción BACH1 también se ve afectada por ROS ya que cuando hay elevados niveles de oxidación, Nrf2 se disocia de BACH1 permitiendo la expresión de genes en respuesta a estrés oxidativo (Kaspar *et al.*, 2009).

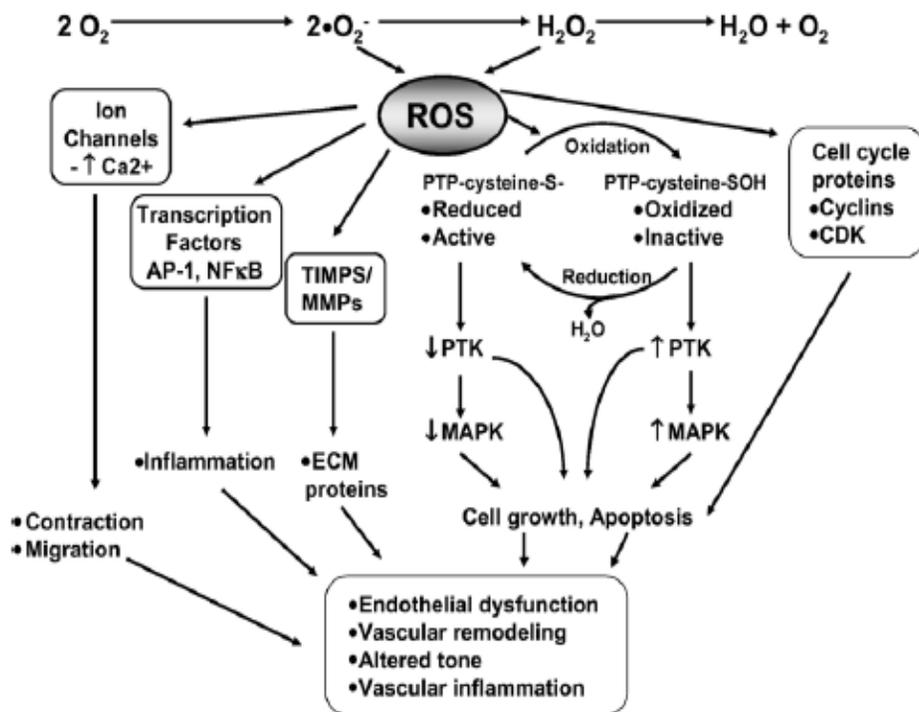


Fig. 3. Las ROS modifican la actividad de las cinasas de tirosinas (PTK), así como Src, JAK2, Pyk2, PI3K y EGFR, así como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), particularmente P38MAPK, JNK y ERK5. Este proceso probablemente ocurre a través de la oxidación/reducción de las proteínas fosfatasa de tirosina (PTP), que son susceptibles a la oxidación y la activación de ROS. Las ROS también influyen la expresión de genes y proteínas activando a los factores de transcripción como NFκB, proteína activadora-1 (AP-1) y el factor inductor de hipoxia (HIF-1). Las ROS estimulan los canales de iones, así como el del Ca⁺ y K⁺, dando lugar a cambios en la concentración de cationes. ECM: matriz extracelular; MMPs: metaloproteinasas de la matriz; TIMP: inhibidor de metaloproteinasas tisulares (Paravicini & Touys., 2006).

En un escenario paralelo, es bien sabido que los miRNAs regulan la expresión de una gran cantidad de moléculas a nivel postranscripcional y se ha demostrado que los miRNAs son importantes controladores de la respuesta inmune (Sathe *et al.*, 2014).

Los miRNAs son secuencias de RNA de cadena sencilla, no codificantes, que constan de 19-22 nts, muchos de ellos son conservados a través de la evolución y su función está directamente relacionada con la inhibición traduccional, al unirse a la región 3'UTR de los RNA mensajeros específicos, dando lugar a la represión de la expresión proteica. Más de 1800 miRNAs son expresados por células de humano; y tienen, en general, el potencial de influir en las rutas moleculares para controlar el desarrollo y la función de múltiples vías, entre ellas las relacionadas con la respuesta antiviral (Sathe *et al.*, 2014).

La función antiviral de los miRNAs ha sido estudiada con el HCV en células Huh-7. En dicho reporte, se utilizaron oligonucleótidos antisentido para secuestrar el miR-122 resultando en una pérdida dramática del RNA viral en células hepáticas (Jopling *et al.*, 2006). En otro estudio, concluyeron que el miR-122 promueve la eficiencia de la replicación del genoma viral, uniéndose directamente a la 5' UTR del RNA genómico y en parte debido a la estimulación de la traducción mediante IRES (Rohit *et al.*, 2010).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se determinó el perfil de expresión de los miRNAs en células hepáticas Huh-7 durante la infección por DENV-2, utilizando la técnica de microarreglos y PCR en tiempo real para su confirmación. Se identificaron 8 miRNAs expresados diferencialmente en células infectadas siendo Let-7c uno de los miRNAs que cambio en mayor medida su expresión (Fig. 4) (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).

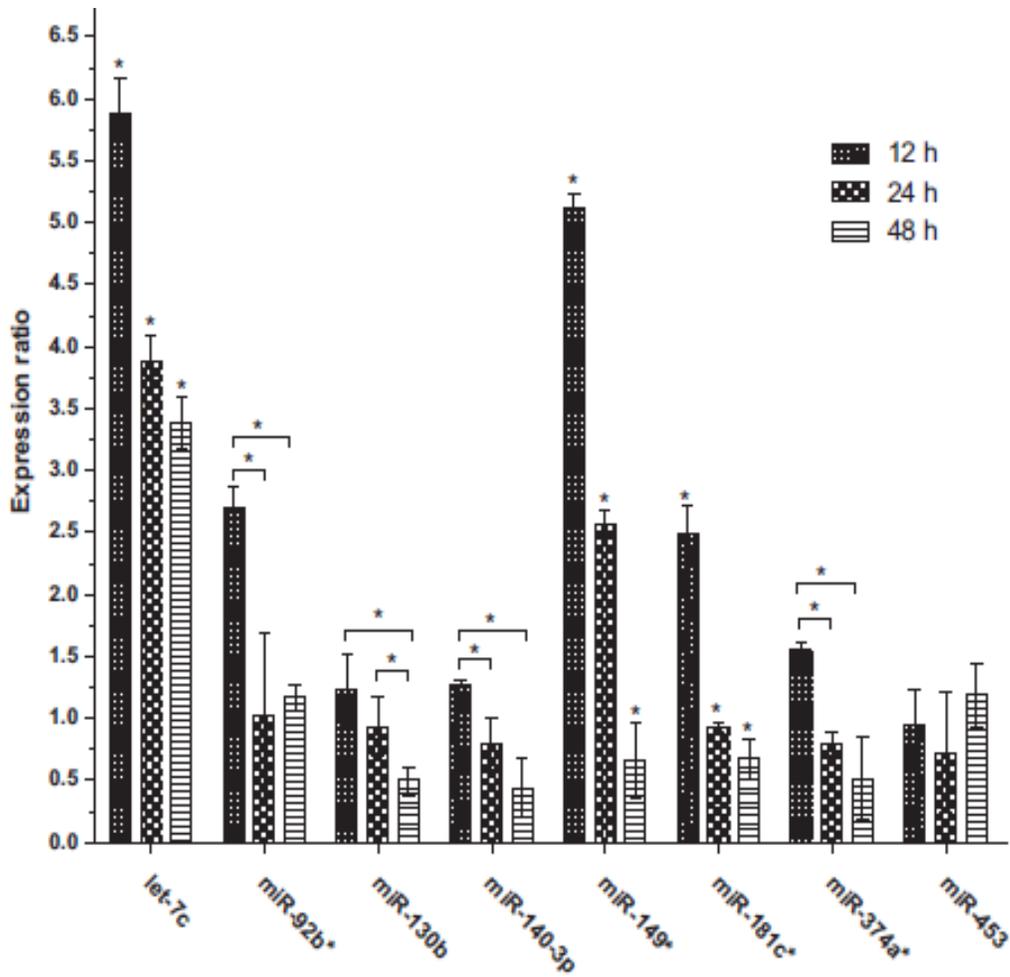


Fig. 4. Nivel de expresión de los miRNAs de células Huh-7 infectadas con DENV determinados por RT-qPCR. Los resultados están expresados como niveles de cambio con respecto a las muestras infectadas falsamente. Se representan las veces de cambio de la expresión del miRNA en células infectadas con respecto a las no infectadas normalizadas usando los niveles de expresión del RNA pequeño RNU6B. También se muestra cada miRNA analizado a diferentes tiempos postinfección. $P \leq 0.05$ (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).

Los ensayos para aumentar o inhibir su función mediante la transfección de precursores o inhibidores sugirieron que Let-7c puede afectar la infección con DENV de forma negativa, fungiendo como una molécula antiviral (Fig. 5).

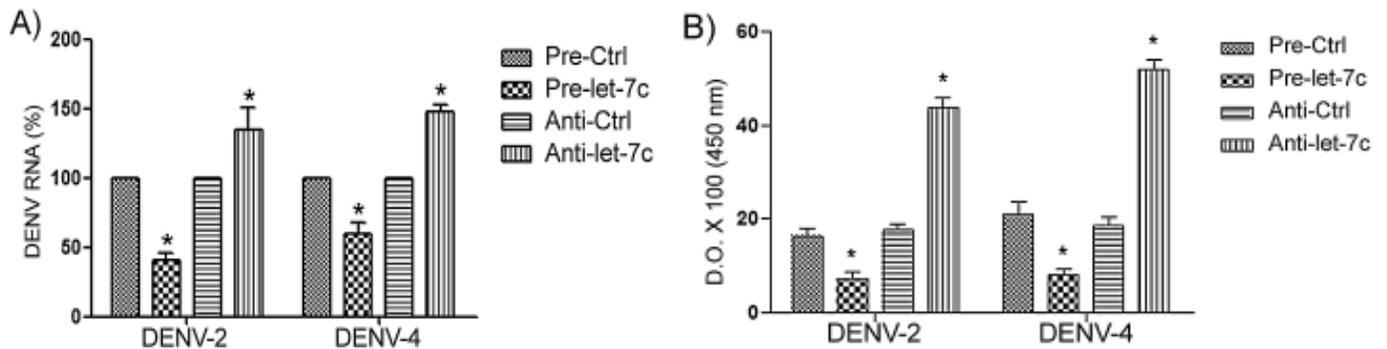


Fig. 5. Nivel del RNA viral y NS1 secretada en células Huh-7 infectadas con DENV. Las células Huh-7 se transfectaron con 50 nM del Pre-miR control negativo (Pre-Ctrl), Pre-miR let-7c (Pre-let-7c), Inh-miR control negativo (Anti-Ctrl) y Inh-miR let-7c (Anti-let-7c) por 24 h, y se infectaron con DENV-2 y DENV-4 por 24 h. A) Porcentaje del RNA viral en las células transfectadas en infectadas comparadas con las condiciones control. B) Detección de la proteínas NS1 en los sobrenadantes de las células Huh-7 tratadas con los Pre-miR o Anti-miR en células infectadas usando el ensayo platelia (BioRad). Las barras en cada columna representan los valores de desviación estándar obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. *p ≤ 0.05. (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).

Let-7c es una familia de miRNAs que consiste de 13 miembros, fue descubierta en *C. elegans* y está involucrada en la regulación de su desarrollo. En humanos Let-7c está involucrado en la supresión de tumores, pero su papel en la inmunidad innata aún no se tiene claro (Fig. 6) (Hou *et al.*, 2010).

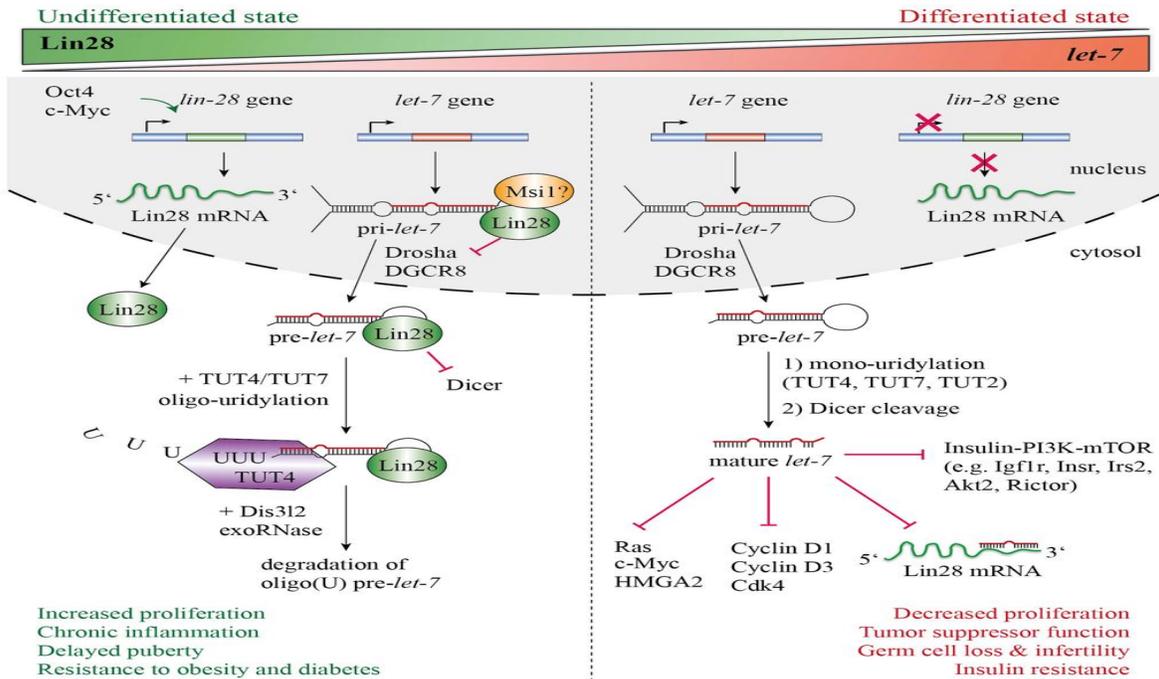


Fig. 6. Eje regulatorio de Let-7c. En las células no diferenciadas, Lin 28 tiene altos niveles de expresión y bloquea la biogénesis del miRNA Let-7c mediante su unión al pri o pre-let-7, y así dichos precursores no pueden procesarse por Drosha o Dicer. Además, Lin28 recluta a TUT4/TUT7 al pre-let 7, promueve su oligo-uridilación y sirve como señal para su procesamiento. Después de la diferenciación celular la expresión de Lin28 se reduce y se aumentan los niveles de Let-7c maduro, lo cual conduce a la disminución en la expresión de diversos proto-oncogenes, genes de factores de progresión del ciclo celular, componentes de la vía de la insulina-PI3K-mTOR y Lin-28 (Mayr & Heinemann., 2013).

Con la finalidad identificar los blancos de Let-7c, se llevó a cabo el análisis “in silico” de los blancos potenciales de dicho miRNA en humano. Una de las moléculas de mRNA que destacó fue BACH1, la cual durante la infección con DENV disminuye considerablemente su expresión (Fig. 7).

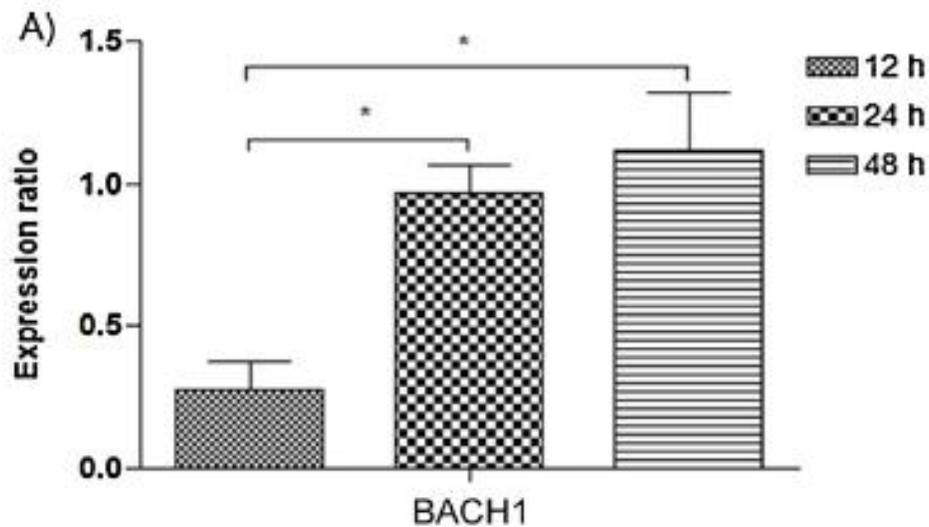
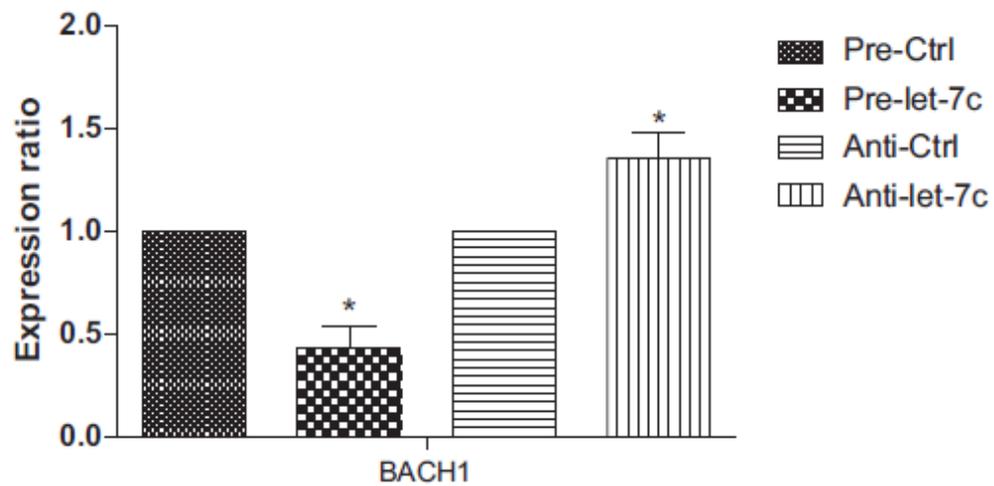


Fig. 7. Niveles de expresión del mRNA de BACH1 en células Huh-7 infectadas con DENV. Las células Huh-7 se infectaron con DENV a una MOI de 3 por 12, 24 o 48 h. El mRNA de BACH1 se determinó mediante RT-qPCR y el mRNA de GAPDH se usó como control de carga. Las barras en cada columna representan los valores de desviación estándar obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$. (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).

Además, como se puede observar en la figura 8, la sobreexpresión o inhibición de Let-7c disminuye o aumenta la expresión de BACH1. Cabe mencionar que Let-7c no tiene un blanco directo importante predicho, en el genoma del DENV (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).



3

Fig. 8. Efecto de let-7c en los niveles del mRNA de BACH1. Las células Huh-7 se transfectaron con 50 nM del Pre-miR-control negativo (Pre-Ctrl) o del Pre-miR let-7c (Pre-let-7c), inhibidor control (Anti-Ctrl) o del inhibidor de let-7c (Anti-let-7c). Después de 48 h de la transfección, el mRNA de BACH1 se cuantificó mediante RT-qPCR. La cuantificación del mRNA de GAPDH se usó como control de normalización. Las barras en cada columna representan los valores de desviación estándar obtenidos a partir de tres experimentos independientes. * $p \leq 0.05$. (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que el nivel de expresión de BACH1 se regula por la expresión de varios miembros de la familia de Let-7, entre ellos Let-7c, comprobando su interacción con la 3'UTR de dicha proteína celular (Hou *et al.*, 2012). Como previamente se ha mencionado la activación de los programas antiinflamatorios y antivirales han sido relacionados con la producción de ROS, los cuales incluyen iones y peróxidos que son subproductos del metabolismo aerobio. Debido a la gran reactividad de ROS, las células poseen mecanismos que mantienen la homeostasis reductiva, siendo necesaria la eliminación de éstas para prevenir la transformación maligna (Fig. 9).

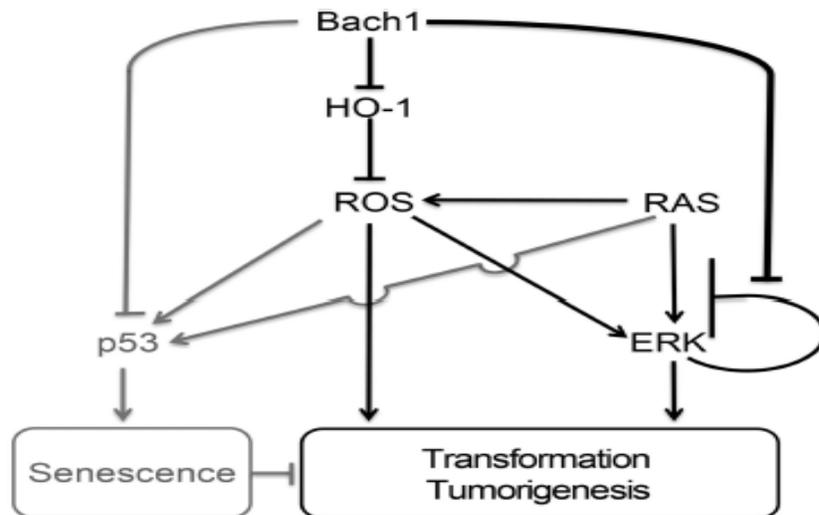


Fig. 9. Vía de BACH1-Ras en células oncogénicas transformadas. BACH1 amortigua la excesiva actividad de los genes que tienen como blanco a p53 y genes de respuesta al estrés oxidativo así como HMOX1 en células normales (líneas grises), estableciendo un umbral para la senescencia. En células transformadas, la función adaptativa de BACH1 cambia la supresión de la retroalimentación negativa inducida por oncogenes y así mantiene los niveles de ROS (líneas negras), facilitando la tumorigénesis (Nakanome *et al.*, 2013).

BACH1 es un represor transcripcional que reprime la expresión de un subconjunto de factores proteicos que reconocen a la proteína MAF y entre los genes blanco de modulación está la hemoxigenasa-1 (HO-1) y globina (Fig. 10).

La proteína HO-1 promueve el reciclaje del hierro y degrada el grupo hemo a hierro férrico, monóxido de carbono y biliverdina que es rápidamente reducida a bilirrubina. Ya que la bilirrubina y el monóxido de carbono (CO) poseen funciones citoprotectoras y el grupo hemo es un potente pro-oxidante, HO-1 protege a las células del estrés oxidativo (Li *et al.*, 2012).

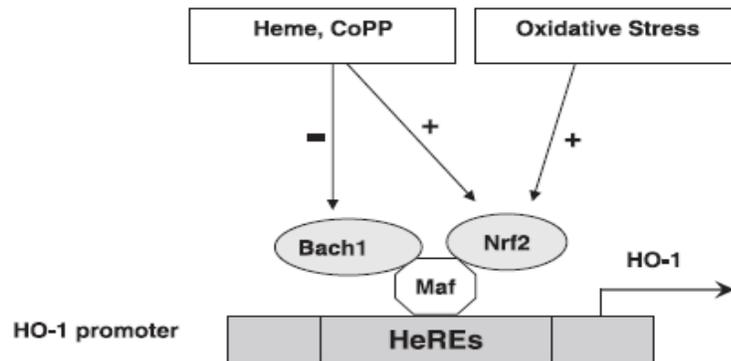


Fig. 10. Modelo esquemático de los represores e inductores de la vía de HO-1. En las condiciones basales, BACH1 es asociado con las pequeñas proteínas Maf y sirve como un represor de HO-1. La regulación celular de los niveles del grupo hemo limitan la expresión de BACH1 y estabilizan a Nrf2, la cual puede formar heterodímeros con Maf con niveles altos del grupo hemo o (CoPP). La expresión de BACH1 es reducida, permitiendo la desrepresión del gen HO-1. (Shan *et al.*, 2006).

Ya que Let-7c se encuentra sobreexpresado en las células infectadas con DENV y su presencia reduce los niveles de expresión de BACH1 se consideró relevante detectar los niveles de expresión aumentados de HO-1 en células infectadas con dengue y en células en donde se sobreexpresa Let-7c. Por lo tanto, se sugiere que en ambos casos el efecto de la regulación transcripcional de BACH1 se encuentra ausente (Fig. 11).

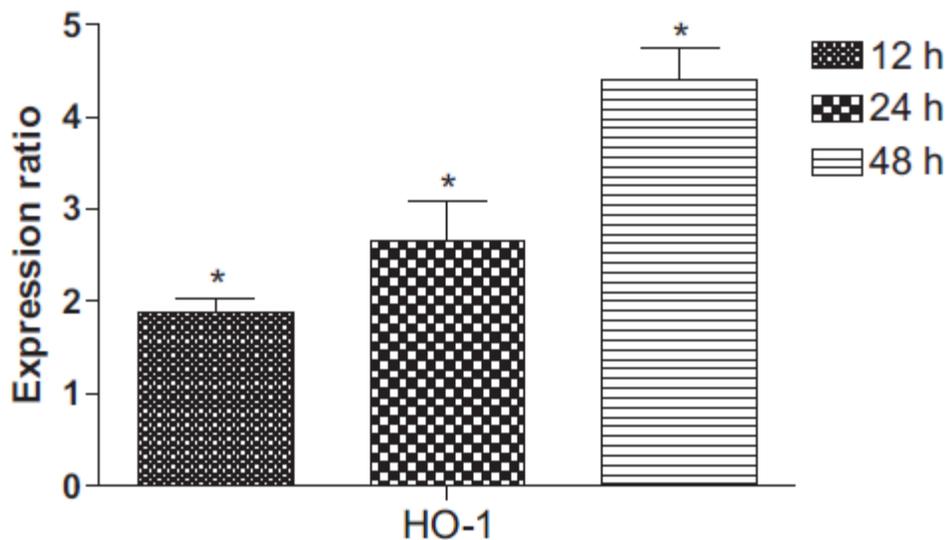


Fig. 11. Nivel de expresión del mRNA de HO-1 en células Huh-7 infectadas con DENV. Las células Huh-7 se infectaron con DENV a una MOI de 3 durante 12, 24 o 48 h y posteriormente el RNA total se utilizó para llevar a cabo la cuantificación del mRNA de HO-1 mediante RT-qPCR. Los niveles del mRNA de GAPDH se usaron para normalizar. Las barras en cada columna representan los valores de desviación estándar obtenidos a partir de tres experimentos independientes. * $p \leq 0.05$. (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).

La regulación de la expresión de BACH1 se ha demostrado en el caso de la infección con HCV, cuya infección induce estrés oxidativo y daño hepático. Durante la infección por HCV se ve aumentada la expresión miR-196, el cual se une directamente a la 3' UTR del mRNA de BACH1, y así regula negativamente a BACH1, aumentando la expresión de HMOX e inhibiendo la replicación de HCV. Por lo anterior, se concluye que el miR-196 tiene actividad antiviral en mayor grado principalmente por la vía de HMOX/BACH1 (Hou *et al.*, 2010).

Por otro lado se encontró que BACH1 es requerido para suprimir a la senescencia celular dependiente de p53 en células MEFs (Murine Embryonic Fibroblasts) en respuesta al estrés oxidativo. En este trabajo se postula a BACH1 como un inhibidor del programa de la senescencia celular mediada por p53 en respuesta a estrés oxidativo (Dohi *et al.*, 2008).

Para caracterizar la relación de BACH1 y p53 se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en donde se encontró que BACH1 forma varios complejos incluyendo los establecidos con el co-represor N-CoR que recluta la deacetilasa de histonas Hdac1. También se confirmó la presencia de N-CoR y Hdac1 en el complejo BACH1-p53. Estos resultados en conjunto constituyen una prueba del mecanismo en respuesta al estrés oxidativo en células senescentes llevan a cabo BACH1 y p53 (Dohi *et al.*, 2008).

También se estudió el complejo que forma BACH1 con otros candidatos como fueron Perp y p21 así como con el enhancer E2 del gen HO-1 (HMOX). BACH1 forma un complejo *Hmox1 E2* solo en células donde había ausencia de p53, reforzando la idea del complejo que se forma entre BACH1 y p53 (Dohi *et al.*, 2008).

Por todo lo anterior resulta muy interesante abordar el estudio del papel que podría tener BACH1 en la infección por el DENV en las células hepáticas Huh-7 y determinar cuál es el efecto de la inhibición de su expresión en la eficiencia de replicación viral. De esta manera se podrían tener elementos para postular una función a este tipo de reguladores del estrés oxidativo en la infección por DENV.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la inhibición de la expresión de BACH1 en la replicación del virus del Dengue.

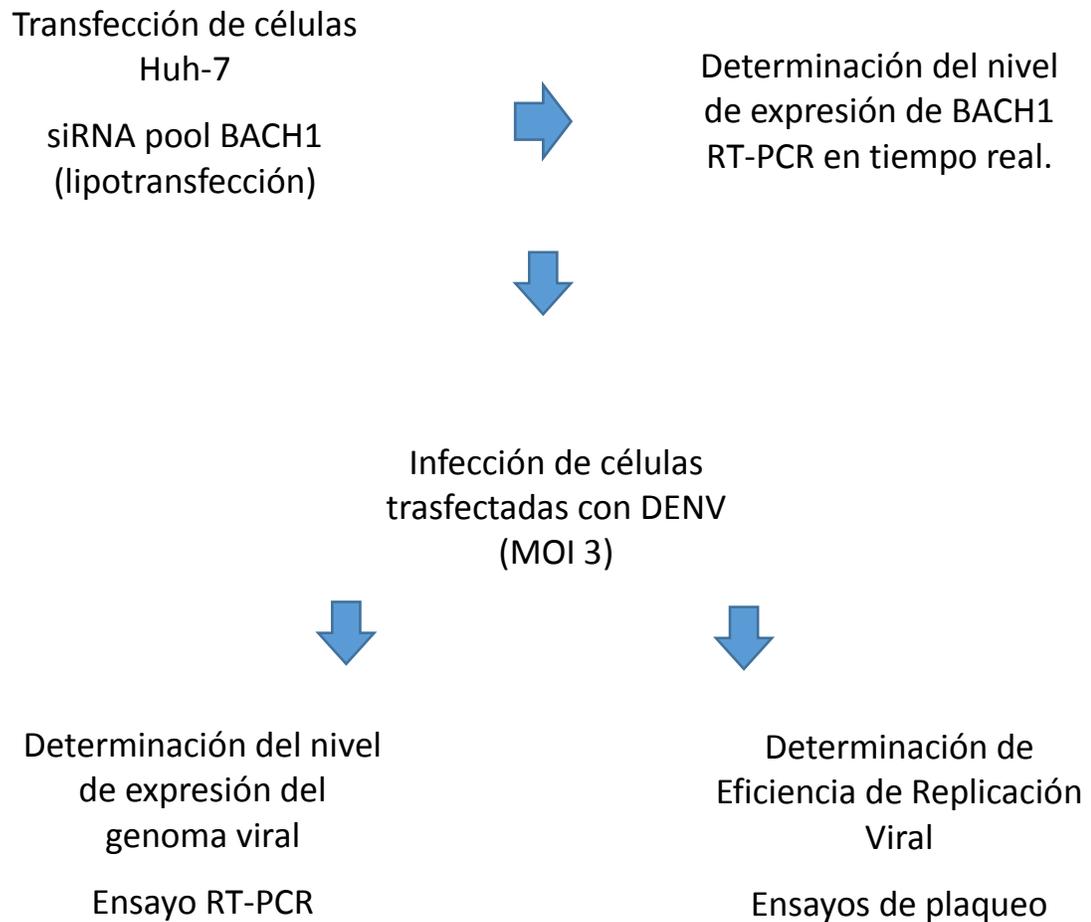
OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Inhibir la expresión de BACH1 en células hepáticas mediante siRNAs.
- 2) Cuantificar los niveles del genoma viral y el virus producido en las células silenciadas.

HIPÓTESIS

La inhibición de BACH1 mediante siRNAs propiciara una disminución en la infección del DENV en células Huh-7.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Los miRNAs podrían influir en el ciclo replicativo de los virus ya que participan en la regulación de la expresión de moléculas celulares o del virus facilitando o inhibiendo la actividad viral.

A la fecha no se ha reportado si existe una relación entre la replicación del DENV y la expresión del represor transcripcional BACH1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

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

Las células se sembraron en placas de 24 pozos y cuando alcanzaron una confluencia del 70% (aprox. 1.4 x 10⁵ células/pozo) se transfectaron mediante lipotransfección. Se utilizó una mezcla del reactivo siPORTamine (Ambion) y diferentes concentraciones del siRNA específico para BACH1 [UCUGGGCUCUCACUAAUCCTG (Applied Biosystems)] y del siRNA control No. 1 (Applied Biosystems). Esta mezcla se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente (TA) y luego se agregó a las células. Después de 24 h post-transfección se realizó un análisis de expresión de BACH1 partiendo del extracto de RNA total o proteínas. Las infecciones se llevaron a cabo usando un extracto de cerebro que contenía DENV a una MOI (del inglés Multiplicity Of Infection) de 3 de la siguiente manera el cual se diluyó en medio DMEM solo y se incubó por 1 h a 37°C (con agitación cada 15 min), después se retiró el medio, se hizo un lavado y se reemplazó con medio fresco.

Extracto de RNA

Las células tratadas en las diferentes condiciones se procesaron para la extracción de RNA de la siguiente manera: se lavaron los pozos con medio y se agregaron 200 µL de Trizol (Invitrogen) el cual se incubó por 5 min, posteriormente se recuperó el extracto y se

guardó a -80°C . En el caso de los sobrenadantes de las células Huh-7 infectadas con DENV se tomó una alícuota de 200 μl de éste y se mezcló con 600 μl de trizol, se homogenizó, se incubó por 10 min a T.A. y se guardó a -80°C . Al día siguiente se agregaron 40 μl de cloroformo frío por cada 200 μl de cada una de las mezclas, se agitaron por 15 s, se incubaron 3 min a T.A. Después se centrifugaron a 12,000 g por 15 min a 4°C , se tomó la fase acuosa y se le agregaron 100 μL de isopropanol frío y se almacenaron a -80°C por toda la noche. Las mezclas se descongelaron y se centrifugaron a 12,000 g por 30min, se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con 500 μL de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 g por 5 min. Se retiró el etanol y se dejó secar la pastilla de RNA por 30 min, la cual finalmente se resuspendió en 12 μL de agua DEPC y se guardó a -80°C .

RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Se tomaron 300-600 ng de extracto de RNA total y se trataron con DNAasa I libre de RNAsa (Promega) incubando a 37°C por 30 min, luego se agregó 1 μl de EDTA (25mM) por 15 min a 70°C para inactivar la DNAsa. Posteriormente el RNA tratado se sometió a una reacción de retrotranscripción usando el kit de RT high fidelity (Applied Biosystems). La reacción se inició adicionando al extracto 0.5mM de hexámeros al azar (Applied Biosystems), incubando a 70°C por 5 min e inmediatamente se dejó en hielo para añadir 2 μl de Buffer de reacción, 1 mM de mezcla de dNTPs, 50 U de retrotranscriptasa high capacity, 20 U de inhibidor de RNAsa y agua DEPC para completar 20 μl . La mezcla anterior se incubó 25°C por 10 min 37°C por 120 min y 85°C por 5 min.

Una fracción de los cDNAs generados por la reacción anterior se usaron para llevar a cabo la reacción de PCR en tiempo real, utilizando TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems) para el gen de expresión constitutiva PPIA y el PCR Master Mix (Applied Biosystems) que funciona con SYBR Green para la detección de BACH1, HO-1 y DENV. La reacción se realizó añadiendo 5 μ l de la mezcla de reacción 2x, 50 pmol del oligo sentido y antisentido para el gen de interés o en su caso 0.5 μ l de la sonda TaqMan 20x para PPIA (Applied Biosystems) y agua DEPC para completar 10 μ l. Las reacciones se realizaron por duplicado y se corrieron en un equipo de tiempo real Applied Biosystems 7300.

La mezcla se trató a 95°C por 1 min, 40 ciclos con las siguientes tres temperaturas: 95°C por 10 s, temperatura de fusión óptima (T_m de 60°C para todos los oligos, excepto DENV que se llevó a cabo a T_m de 55°C) del par de nucleótidos por 10 s y 72°C por 30 s. La cuantificación de expresión relativa de los diferentes RNAs se determinó mediante el método de $\Delta\Delta CT$, utilizando PPIA como normalizador.

En el caso de los extractos de RNA provenientes de las células infectadas se procedió a realizar el tratamiento con DNAsa, descrito anteriormente, y posteriormente se llevó a cabo RT-qPCR en un solo paso utilizando una tercera parte del RNA extraído y tratado con la nucleasa. La RT-qPCR de un solo paso se realizó con el kit One Step RT-PCR Superscript III (Invitrogen) y con las condiciones de amplificación descritas anteriormente para DENV.

Gen blanco	Secuencia del Oligonucleótido	Tamaño del amplicón
DENV	FW 5´ -TAC AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG AAA AA -3´ RV 5´ -GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC- 3´	255 pb
BACH1	FW 5´-GGA CAC TCC TTG CCA AAT GCA-3´ RV 5´ TGA CCT GGT TCT GGG CTC TCA C-3´	126 pb
GAPDH	FW 5´-TGC MTC CTG CAC CAC CAA CT y RV 5´ YGC CTG CTT CAC CAC CTT C-3	350 pb
HO-1	FW 5´-CGG GCC AGCGAT GGG ATT AAC AAA GTG-3´ RV 5´ AGT GTA AGG ACC CAT CGG AG-3´	107 pb

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para amplificar los genes (DENV, BACH1, GAPDH y HO-1).

Ensayo de plaqueo por virus del DENV

Las células BHK-21 se sembraron en placas de 24 pozos y después de 24 h se incubaron con los sobrenadantes de las células infectadas a titular, los cuales se utilizaron para hacer diluciones seriadas en un volumen total de 500µL de medio Hank´s (Gibco-BRL) [Suplementado con 0.5% de SFB y antibióticos (penicilina y estreptomina)].

Después se agregó 1 ml de carboximetilcelulosa completa [1x de medio MEM (Gibco-BRL), 5% de suero fetal bovino, antibióticos (penicilina, estreptomina), glutamina y 0.8% de carboximetilcelulosa] y se incubó por 5 días a 37°C. Después de los 5 días se descartó el medio y se tiñeron las células con NBB (0.05% de Naphtol Blue Black en 9% de ácido acético y 100 mM de acetato de sodio) por 30 min a TA. Después se descartó el NBB y se lavaron los pozos sumergiendo las placa en agua y decantando el contenido para iniciar el conteo del número de placas producidas en cada dilución para obtener el número de PFUs/ml (del Inglés, Plaques forming Units). Posteriormente se retiró el medio de las células BHK-21 y se

añadieron 200µL de la dilución viral incubándose por 1 h a 37°C. Las diluciones virales se titularon por duplicado.

Western Blot

Las células Huh-7 fueron sembradas en placas de 24 pozos, tratadas o sin tratar, se lisaron añadiendo 250µl de buffer Laemmli 5X [SDS 10%, Glycerol 50%, β-mercaptoethanol 25%, Azul de Bromofenol 0,01%, 1.5 M Tris-HCl pH 6.8] a cada pozo, después de 5 min de incubación a TA se recogió el extracto, se hirvió por 5 min y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Los extractos proteicos totales se separaron en geles de SDS-PAGE al 12% a corriente constante de 100V. Posteriormente el gel se transfirió a papel de nitrocelulosa (0.22µM, BIO RAD), en presencia del buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, 20% metanol, pH 8.3) utilizando una cámara semiseca, que se programó a 12V por 1 h 20 min. Las proteínas transferidas se visualizaron con el colorante Rojo de Ponceau el cual se eliminó haciendo un lavado con PBS. La membrana conteniendo las proteínas transferidas se bloqueó con PBS-Leche descremada al 10% por 2 h en agitación suave a TA y al finalizar esta etapa se lavó con PBS.

Posteriormente se incubó el anticuerpo primario de conejo contra BACH1 (GTX63193, GeneTex) o de ratón contra el control de carga o β-Tubulina (Chemicon) como control de carga a una dilución de 1:1,000 y 1:5,000 respectivamente, la incubación se hizo por 1 h a TA y después toda la noche a 4°C en agitación suave. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS/Tritón 0.5% por 5 min y al finalizar se incubó con el anticuerpo secundario

anti-conejo o anti-ratón acoplado a HRP diluido 1:100,000 (Jackson) por 1 h a TA en agitación suave, al terminar se lavó de la misma manera que el anticuerpo primario y se reveló por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo) y se visualizó en el equipo ChemiDoc MP Imaging system. Las bandas se cuantificaron utilizando el software Image Lab (Bio Rad).

RESULTADOS

El interés por el estudio de BACH1 se genera por los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los cuales se determinó mediante microarreglos de miRNAs donde Let-7c se ve aumentado después de la infección por DENV. Los estudios “in silico” de los blancos potenciales de Let-7c nos dieron una lista de mRNAs que podrían ser modulados negativamente por la expresión de Let-7c. Uno de los blancos predichos es el mRNA de BACH1 el cual tenía un perfil alto en la valoración como blanco potencial, por lo cual se decidió determinar si este mRNA era modulado en la infección por DENV así como en el mimetismo e inhibición de Let-7c. Los resultados obtenidos nos indicaron que el mRNA y la proteína de BACH1 disminuían en la infección por DENV y aumentan su expresión en la inhibición específica de Let-7c (Escalera-Cueto *et al.*, 2015).

Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue conocer el efecto de la inhibición de la expresión de BACH1 en la replicación del DENV.

La estrategia experimental abordada para inhibir la expresión de BACH1, fue el uso de siRNAs específicos para dicho mensajero, los cuales se introdujeron a las células mediante el protocolo de lipotransfección. La línea celular en la cual se llevó a cabo este trabajo fue Huh-7, que son hepatocitos provenientes de hepatoma humano, mismas células que las utilizadas para los resultados del microarreglo antes mencionado.

Se llevaron a cabo varios experimentos para determinar la concentración y el tiempo más adecuado para inhibir a BACH1 en la línea celular Huh-7, siendo elegida esta línea celular por la propensión que tiene a ser infectada por el DENV. En la Fig. 12, se muestra el

resultado de un Western Blot en el cual se probaron extractos proteicos totales de células Huh-7 a una confluencia aproximada del 80% transfectadas con (0.10, 0.14 Y 0.15nM) de siRNA contra BACH1 por 72 h. La señal del anticuerpo específico para BACH1 indicó una disminución gradual de la proteína conforme se aumentó la concentración de siRNA utilizado. El control de carga empleado para este experimento fue β -Tubulina, con la cual se normalizó y cuantificó la banda de BACH1.

Como se pudo observar en la figura 12, la concentración de 0.15 nM del siRNA contra BACH1 fue la que mayormente inhibió la expresión de dicha molécula por lo cual se utilizan igual estas condiciones en los experimentos subsecuentes.

La densitometría de las bandas realizada, confirmó que la concentración de 0.15 nM de siRNA fue la que más inhibió a BACH1 alcanzando hasta 42.4% de inhibición, a diferencia de las células que fueron tratadas con siC.

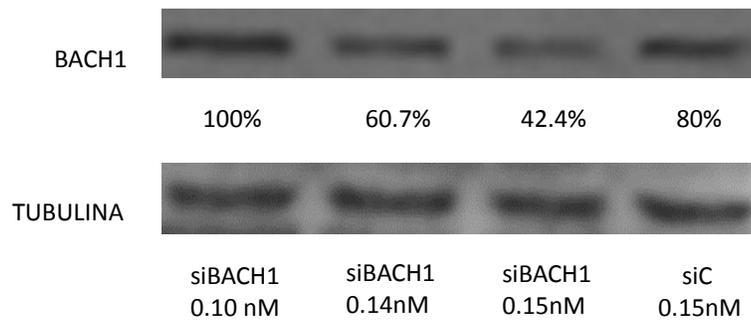


Fig. 12. Inhibición de la expresión del represor transcripcional BACH1 mediante silenciamiento por siRNAs. Las células Huh-7 fueron transfectadas con diferentes concentraciones de siRNA para siBACH1 y con el siRNA control (siC) posteriormente se separaron en geles de SDS-PAGE al 10%. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y éstas se bloquearon e incubaron en el anticuerpo anti-BACH1 o con un anticuerpo anti-Tubulina como control de carga. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario y se revelaron por quimioluminiscencia. El análisis densitométrico se realizó con el programa Image Lab de (BIO-RAD).

Con la finalidad de determinar el efecto que tiene la inhibición de la expresión de la proteína de esta proteína en la capacidad del virus de multiplicarse, se realizó el silenciamiento de BACH1 usando 0.15 nM del siRNA específico por 72 h y posteriormente se infectaron las células por 24 h con DENV-4. El RNA total de los sobrenadantes de las células tratadas se utilizó para llevar a cabo la amplificación de una región del genoma viral de 255 nt que corresponde a la secuencia de la proteína NS5. Como se puede observar en la figura 13, el tratamiento de las células con siBACH1 afectó la abundancia del genoma viral debido a que el nivel de expresión de éste se encuentra disminuido a comparación con la banda obtenida a partir de las células tratadas con el siRNA control. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas mostró una disminución de más del 40% de la intensidad de la banda en el caso de las células tratadas con siBACH1 cuando se compara con la señal obtenida en el caso del tratamiento con el siC. Los resultados mostrados hasta ahora nos indican que la interferencia específica de la expresión de BACH1 disminuye la cantidad del genoma viral extracelular.

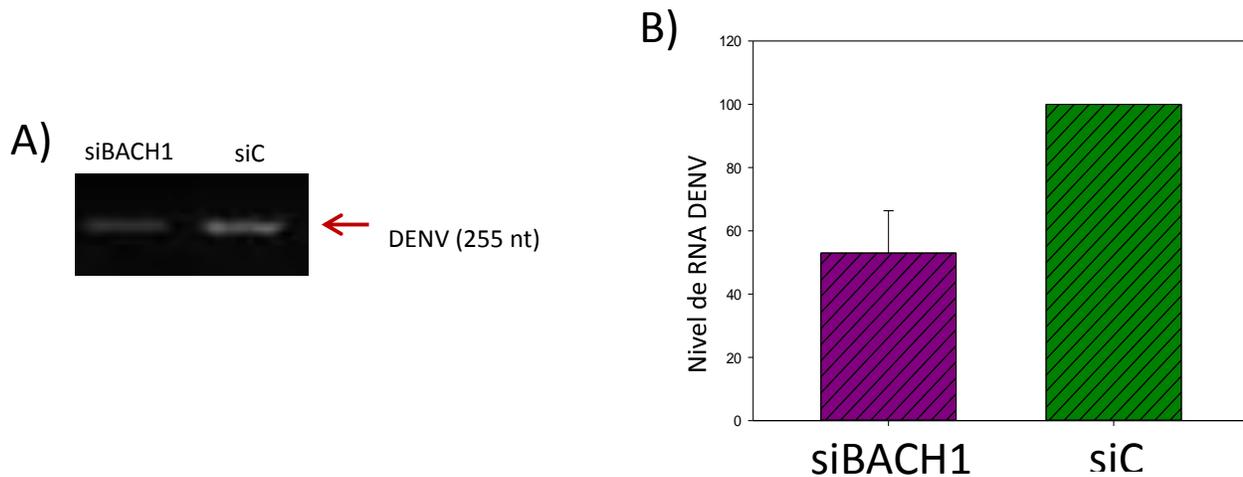


Fig. 13. Detección del RNA viral de los sobrenadantes de las células tratadas con siBACH1 y siC. **A)** Las células Huh-7 se transfectaron con 0.15 nM del siRNA para BACH1 (siBACH11) y del siRNA control (siC). A las 72h post-transfección las células se infectaron con DENV-4 por 24h y posteriormente los sobrenadantes se trataron con Trizol para la obtención de un extracto total de RNA. El RNA total se utilizó para la amplificación de una región de la proteína NS5 del genoma viral mediante RT-PCR en punto final. Los amplicones obtenidos se separaron en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes mostradas representan los resultados de tres experimentos independientes **B)** La gráfica muestra la cuantificación de la intensidad de la banda de las muestras tratadas con el siBACH1 con respecto a las tratadas con el siC (realizado con el programa Image Lab, BIO RAD). La barra corresponde a la desviación standard de los tres experimentos independientes mostrados en “A” calculada con el programa Sigma Plot.

Para corroborar los resultados anteriores, se llevaron a cabo experimentos de RT-qPCR, tanto para determinar la abundancia del mRNA de BACH1 como para determinar el nivel del genoma viral en las células tratadas e infectadas. En la figura 14A se puede observar que en las células tratadas con el siRNA para BACH1, se detectó una reducción considerable del mRNA de dicho gen, en comparación con el nivel del mRNA de BACH1 en las células tratadas con el siRNA control. Por otro lado, para saber si la replicación del virus se veía afectada por la inhibición de BACH1 se llevó a cabo la amplificación de NS5 en el genoma viral. Lo anterior se realizó por el método de RT-qPCR utilizando la tinción de los productos amplificados con SYBR Green. En la figura 14B se puede observar que el nivel del genoma viral en las células que fueron tratadas con siRNA contra BACH1 fue menor que en las células que fueron tratadas con siRNA control. Para estos experimentos se usó el nivel de amplificación del mRNA de PPIA para normalizar la detección y proceder a la cuantificación usando el método de $\Delta\Delta C_t$.

Este resultado sustenta la hipótesis de que bajos niveles de BACH1 disminuyen el nivel de infección viral en las células Huh-7.

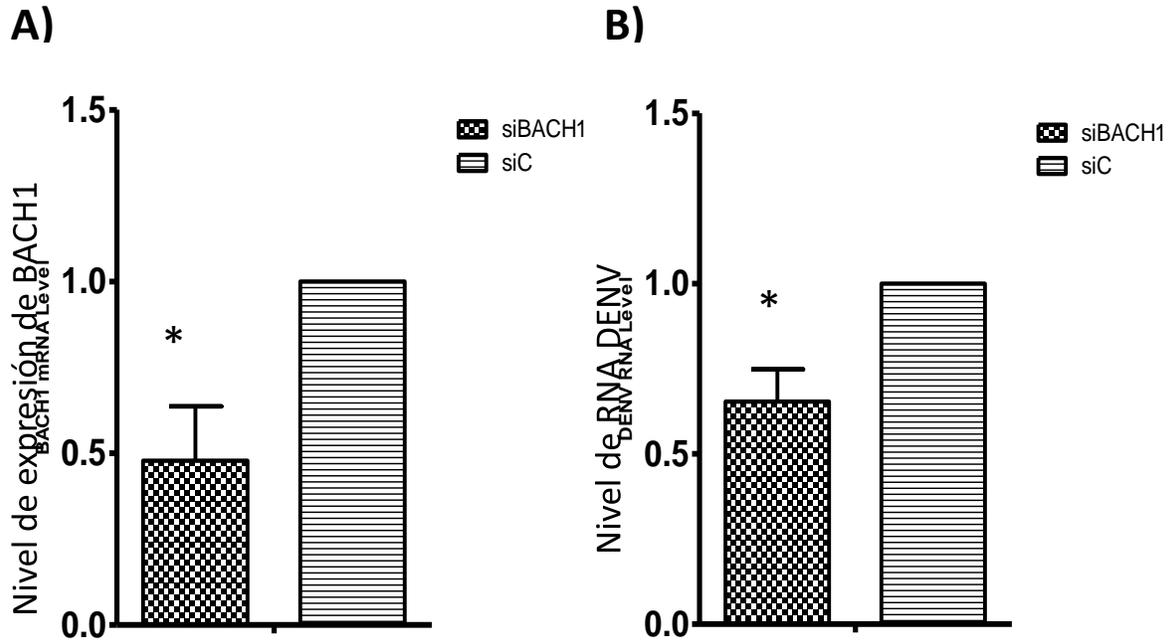


Fig. 14. Análisis de tiempo real del nivel de expresión de BACH1 y DENV en células tratadas con siBACH1 e infectadas. A) Las células Huh-7 se transfectaron con 0.15 nM del siRNA para BACH1 y del siRNA control. A las 72h post-transfección las células se infectaron con DENV-4 por 24h y se trataron con Trizol (Invitrogen) para la obtención de un extracto total de RNA. El RNA total se utilizó para la amplificación mRNA de BACH1 mediante PCR tiempo real. **B)** El extracto de RNA también se utilizó para la amplificación de una región de NS5 del genoma viral mediante RT-PCR en tiempo real. El mRNA de expresión constitutiva PPIA se usó como control de normalización en ambos casos. En el eje Y se graficó el nivel de expresión calculado mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. Las barras corresponden a la desviación standard de tres experimentos independientes. * $P \geq 0.05$.

Por otra parte, como una manera de corroborar los resultados anteriores, se llevó un ensayo de plaqueo, utilizando los sobrenadantes de células que fueron transfectadas con siRNA contra BACH1 y después de 72 h fueron infectadas con DENV-4 por 24 h. El número de placas de infección producidas por los sobrenadantes del tratamiento con siBACH1 fue 40% menor que el número de placas producidas utilizando el sobrenadante de las células transfectadas con el siRNA control. Los experimentos antes mencionados muestran que la hipótesis de que la ausencia de la proteína de BACH1 afecta la replicación del virus del DENV. Como se mencionó anteriormente BACH1 es un represor transcripcional de HO-1, el cual se ha reportado que degrada al grupo hemo y regula el estrés oxidativo (Ota *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2002). Para determinar si la inhibición de BACH1 en las células Huh-7 afecta la regulación transcripcional de este gen, se realizaron ensayos de RT-qPCR de punto final en los cuales se determinó el nivel del mRNA de HO-1.

Como se puede observar en la figura 15, las células tratadas con el siRNA para BACH1 expresan una mayor cantidad del mRNA de HO-1 con respecto a las células tratadas con el siRNA control. Por otro lado, los resultados con las células que fueron tratadas con el siRNA para BACH1 y posteriormente infectadas por 24 h con DENV-4 presentaron un ligero aumento en la expresión de HO-1. Estos resultados podrían indicar que la disminución de BACH1 aumenta la expresión de HO-1, probablemente como una reacción al estrés oxidativo que genera el virus al multiplicarse en la célula hospedera.

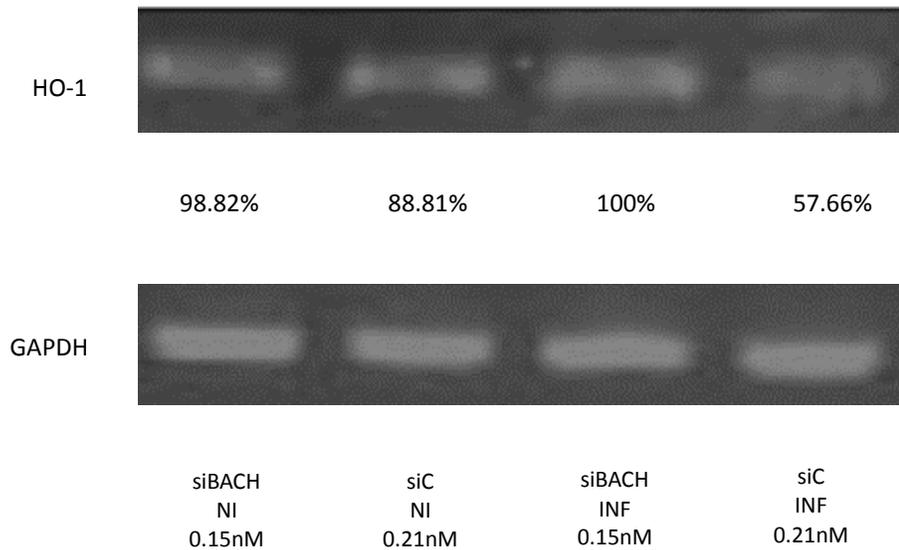


Fig. 15. Nivel de expresión de HO-1 en células tratadas con siBACH1 no infectadas e infectadas con DENV. Las células Huh-7 se transfectaron con 0.15 nM del siRNA para BACH1 y del siRNA control, a las 72 h post-transfección fueron infectadas (INF) o no (NI) con DENV-4 por 48 h a una MOI de 3 y posteriormente se trataron con Trizol para la obtención de un extracto total de RNA. El RNA total se utilizó para la amplificación de una región del mRNA de HO-1 y de GAPDH mediante PCR.

DISCUSIÓN

Los virus intervienen en las cascadas de señalización de la célula hospedera para poder infectar y replicarse, de manera que cuando las señales llegan al núcleo interfieren con el patrón de expresión genética de las células eucariotas, en donde la especificidad de estas interacciones depende del blanco celular que sea infectado.

Por ejemplo, el virus de la Influenza toma ventaja de la maquinaria celular, manipulándola y afectando la respuesta antiviral del huésped; específicamente en el caso de la respuesta antiviral del huésped generada por la vía de NF- κ B antagonizándola con la proteína viral NS1, que a la vez, activa la vía de PI3K/Akt; esta vía promueve la sobrevivencia celular y al igual que NF- κ B, hacen que la replicación y propagación viral sea más eficiente (Gaur *et al.*, 2011). Del mismo modo, las vías de MAPK, PKC/PKR y TLR/RIG-1 que son vías que intervienen como rutas antivirales inducidas por las cascadas inflamatorias de citocinas, son inhibidas para que de esta manera se incremente la formación de viriones infecciosos (Gaur *et al.*, 2011).

El DENV induce estrés oxidativo y sobrerregula la expresión de algunas citocinas incluyendo el mRNA de RANTES en células hepáticas, mediante la activación de IL-6 lo que se correlaciona con una mayor replicación viral (Lin *et al.*, 2000). Ha sido demostrado que la infección de algunos virus induce la expresión de RANTES. La deficiencia de RANTES o de CCR5 exacerba el estrés oxidativo en células hepáticas y conlleva a un nivel alto de producción de aniones y una mayor inflamación hepática (Chen *et al.*, 2009).

En nuestro grupo de trabajo se han investigado las cascadas de señalización inducidas por la infección con DENV, en este caso en particular son básicamente dirigidas por el miRNA Let-7c. Este miRNA tiene como blanco al inhibidor transcripcional BACH1.

Cabe señalar que la infección por DENV conlleva una serie de eventos que involucran moléculas que se relacionan con el estrés oxidativo celular lo cual potencia la infección, el daño en los programas celulares y la propensión a cáncer (Olagnier *et al.*, 2014).

La expresión de HO-1 es protectora contra el daño de tejido en distintos órganos como el corazón, hígado, pulmón e intestino; sin embargo también se ha descrito que la sobreexpresión de HO-1 ha sido considerada patológica ya que participa en la acumulación de hierro, daño mitocondrial y en enfermedades neurodegenerativas (Ota *et al.*, 2014).

Recientemente nuestro grupo de trabajo encontró que en las células hepáticas humanas Huh-7, el virus DENV eleva las concentraciones del supresor de tumor Let-7c el cual regula la respuesta antiviral. El aumento en la expresión de Let-7c regula negativamente la expresión de BACH1 debido a dos secuencias blanco en la región no traducida 3' del mRNA de esta proteína. BACH1 es un modulador transcripcional que modula el estrés oxidativo generado por diversos estímulos entre los que se encuentran los programas inflamatorios y antivirales.

Es bien sabido que BACH1 es un represor de la transcripción de HO-1, lo cual resulta en regulación del estrés oxidativo (Ota *et al.*, 2014). La inhibición de BACH1 mediante siRNA ha sido previamente abordada por otro grupo de trabajo en donde encontraron que células tratadas con 100 a 200 nM de dicho siRNA por 72 h promovía la disminución del nivel del

mRNA de BACH1 hasta un 30% comparado con las células tratadas con el control, lo cual en general concuerda con nuestros resultados (Shan *et al.*, 2004).

En nuestro estudio se pudo observar que en ausencia de BACH1 hubo una disminución del genoma viral con respecto al control, estos resultados son similares a los casos en donde la infección por HCV, HIV y HBV también se ve afectada negativamente en ausencia de BACH1 (Schmidt *et al.*, 2002). Este mismo autor también encontró que la expresión de HO-1 se incrementa en células infectadas con DENV; postulando a HO-1 como molécula antiviral en infección por DENV. Así queda como perspectiva para próximos estudios el análisis de la función del eje BACH1/HO-1 y su probable papel en la regulación de la inmunidad inata.

La proteína HO-1 es particularmente importante para la función presentadora de antígeno en células como los macrófagos y las células dendríticas. Además de dichos efectos en el sistema inmune, HO-1 está implicada en la regulación del estrés oxidativo así como lo mencionado en la activación de la vía de RANTES para contrarrestar el daño celular ocasionado por este estrés (Lin *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

La deficiencia de BACH1 en células infectadas con el virus DENV promueve una disminución de la replicación viral.

REFERENCIAS

- Alcaraz-Estrada, S, L., Yocupicio-Monroy., del Angel, RM. (2010). Insights into dengue virus genome replication. *Future Virol.* **5**, 575–592.
- Chen Fang-Yu, Chang Hen-Hong, Lee Tzung-Yan. (2009). CCR5 Deficiency Exacerbates Oxidative Stress is Associated with Impairs Senescence Marker Protein-30 Generation in Bile Duct Ligation Mice **50**, S.1. S337.
- Dohi, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Katoh, Y., Ota K., Nakanome A., Muto A., Omura S., Ohta T., Ito A., Yoshida M., Noda T & Igarashi K. (2008). Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1246-1254.
- Clyde, K., Kyle J, L., Harris E. (2006). Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J. Virol.* 11418–11431 **80**,
- Cullen, B. (2011). Viruses and microRNAs: RISC y interactions with serious consequences. *Gene Dev.* **5**, 1881–1894.
- Escalera-Cueto, M., Medina-Martinez I., del Angel R.M., Berumen-Campos J., Gutiérrez-Escolano AL., Yocupicio- Monroy, M. (2015). Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. *Virus Res.* **196**, 105-112.

- Gandini, M. Nogueira, S. R., Reis, I., Torrentes-Carvalho, A., Azeredo, E. A., Freire, M. S., Galler, R., Kulbeka, C. F. (2011) Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF- α and IFN- α profiles *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**, 594-605.
- Gaur, P., Munjal, A., Lal, S.K. (2011). Influenza virus and cell signaling pathways. *Med Sci. Monit.* **17**, 148-154.
- Hou, W., Tian, Q., Zheng, J., Bonkovsky, H.L. (2010). MicroRNA-196 Represses Bach1 Protein and HCV Gene Expression in Human Hepatoma Cells Expressing Hepatitis C Viral Proteins. *Hepatology* **51**, 1494–1504.
- Jangra, RK., Yi, M., Lemon, S.M. (2010). Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA. *J. Virol.* **84**, 6615–6625.
- Jopling, C.L. (2008). Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem Soc Trans* **36**, 1220-1223.
- Jopling, C.L., Norman, K.L. and Sarnow, P. (2006). Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 369-76.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. and Sarnow, P. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577-1581.

- Kaspar, J. W., Niture S. K., Jaiswal, Anil, K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **10**, 10-16.
- Kondo, K., Ishigaki, Y., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Sawada, S., Muto, A., Oka, Y., Igarashi, K., Katagiri, H. (2013). Bach1 deficiency protects pancreatic cells from oxidative stress injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **5**, 641-648.
- Lin Y.L., Liu C.C., Chuang J.I., Lei H.Y., Yeh T.M., Lin Y.S., Yng H.H., Hsiao-S.L. (2000). Involvement of Oxidative Stress, NF-IL-6, and RANTES Expression in Dengue-2-Virus-Infected Human Liver Cells. *Virology* **276**, 114-126.
- Li, J., Shiraki, T., Igarashi. (2012). Bach1 as a regulator of mitosis, beyond its transcriptional function. *Commun. Integr. Bio.* **5**, 477-479.
- Mayr, F., Heinemann, U. (2013) Mechanisms of Lin28-Mediated miRNA and mRNA Regulation—A Structural and Functional Perspective. *Int J Mol Sci.* **14**, 16532–16553.
- Nakanome, A., Brydun, A M., Matsumoto, K., Ota, Funayama, R., Nakayama, K., Ono M., Shiga, Kobayashi, T., Igarashi, K. (2013) Bach1 is critical for the transformation of mouse embryonic fibroblasts by RasV12 and maintains ERK signaling. *Oncogene* **32**, 3231–3245.
- Navarro-Sánchez, E., Despres P., Cedillo-Barron L. (2005). Innate Immune Responses to Dengue Virus. *Arch. Med. Res.* **36**, 425–435.

- Olagnier, D., Suraj, P., Steel C., Van M.N., Chiang, C., Beljanski, V., Slifker, M., He Z., Nichols, C.N., Lin, R., Balachandran, S., Hiscott, J. (2014). Cellular Oxidative Stress Response Controls the Antiviral and Apoptotic Programs in Dengue Virus-Infected Dendritic Cells. *PLOS pathogens* **10**, 1371-1389.
- Ota, K., Brydun, A., Itoh, N.A., Sun, J., Igarashi K. (2014). Bach1 Deficiency and Accompanying Overexpression of Heme Oxygenase-1 do not Influence Aging or Tumorigenesis in Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-12.
- Paravicini T. M., Touyz R.M. (2006) Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* **71**, 247-258.
- Qi Rui-F., Ling, Z., L., Chi Cheng-W. (2008). Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **40**, 91-101.
- Rothman, Alan, L. (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* **113**, 946-951.
- Rohit K. J., MinKyung, Yi., Stanley M. L. (2010). Regulation of Hepatitis C Virus Translation and Infectious Virus Production by the MicroRNA miR-122. *J. Virol.* **84**, 6615–6625 .
- Sathe, A., Ayyar, Kanchana., Reddy KVR.(2014). MicroRNA let-7 in the spotlight: Role in innate immunity. *Inflamm. Cell Signal* **1**, 66-75.

- Schmidt, Warnatz, HJ., D., Manke, T., Piccini, I., Sultan, M., Borodina, T., Balzereit, Wruck, W., Soldatov, A., Vingron, M., Lehrach, Yaspo, ML. (2011). The BTB and CNC Homology 1 (BACH1) Target Genes Are Involved in the Oxidative Stress Response and in Control of the Cell Cycle. *Commun. Integr. Bio.* **5**, 477-479.
- Schmidt, W.N., Mathahs, M., Meleah, Z., Zhaowen. (2002). Heme and HO-1 inhibition of HCV, HBV, and HIV. *Front. Pharmaco.* **13**, 1-17.
- Shan Y, M.D., W.R., Lambrecht, Ghaziani, T., M.D., E.,S.,Donohue, L.,H. Bonkovsky, M.D. (2004) Role of Bach1 in Regulation of Heme Oxygenase1 in Human Liver Cells: Insights from Studies with Small Interfering RNAs *J. Biol. Chem* **279**, 51769–51774
- Shan, Y., Lambrecht R W., Donohue, S. E., Bonkowsky, H. B. (2006) Role of Bach1 and Nrf2 in up- regulation of the heme oxigenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**, 2651-2653.
- Takada, T., Miyaki, S., Ishitobi, H., Nakasa, T., Igarashi, K., Martin, K., Lotz, Ochi, M. Bach1 Deficient Mice Reduce Severity of Age-related Osteoarthritis Through the Maintenance of Autophagy and SOD2