



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Efecto del silenciamiento de la proteína
mitocondrial YME1L1 en la infección
por dengue**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Kevin Alberto López Sánchez

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy



Ciudad de México, Agosto de 2025

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

INTEGRACIÓN DE JURADO

Presidente: Dra. Lilia López Canovas.

Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

Secretario: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

Vocal: Dr. Juan Santiago Salas Benito

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

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

Agradecimientos

A la UACM debido a que este trabajo fué financiado mediante el proyecto del Colegio de Ciencia y Tecnología UACM CCYT-2023-INI-15. Así como el otorgamiento de la beca de tesis por 9 meses para la realización del proyecto.

Al posgrado en Ciencias Genómicas por permitir la publicación de un artículo junto con la Dra. Martha Yocupicio el cual lleva por título "Impacto de los virus transmitidos por mosquitos en la función mitocondrial" en la gaceta "Genómicas Hoy" número 29.

A mi directora de tesis, la Dra. Martha Eugenia Yocupicio Monroy, por enseñarme, y sobre todo su paciencia en guiarme en este proceso, ayudándome a mi desarrollo académico. Lo cual el haber trabajado de su mano me permitió adquirir una gran experiencia. Siempre recalcando en su gran paciencia, apoyo y sobre todo en que es una excelente mentora.

A la Dra. Olga Nohemí Hernández, quien me ha ayudado desde el comienzo, desde compartir sus conocimientos y experiencias que han sido un gran apoyo, siempre estaré agradecido por el tiempo y esfuerzo que ha hecho.

A mis compañeros de laboratorio que estuvieron conmigo desde el comienzo de este proceso y los que fui conociendo a lo largo de este, desde haber iniciado esta etapa junto con Brenda, una muy buena amiga y compañera, la cual pronto terminará también este proceso, así como a Oscar quien me ha apoyado tanto académicamente, el haber conocido a Paulina después de haber iniciado este proyecto, permitiendo enseñar y aprender con ella, por estar ayudándome tanto de manera personal y en laboratorio durante este proceso, realmente te agradezco; también a Karina que aun pese no ser miembro del laboratorio fue una gran compañera del posgrado, aconsejando y teniendo paciencia conmigo.

A mis amigos de la licenciatura, Mario, Norma, Katia, Sotelo, Jaime, Javier, con quienes pasé buenos momentos, agradeciendo su apoyo y ánimos en esta etapa.

A las Licenciadas Vivi, Caty y Danna por apoyarme en los trámites del posgrado y diversos procesos académicos importantes durante esta etapa.

A mi familia que siempre me ha apoyado y tenido paciencia, siempre se los agradeceré, pues siempre han demostrado el valor del esfuerzo, lo cual me ha motivado a seguir adelante, gracias por que sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A todas las personas que no mencioné pero que estuvieron conmigo en este proceso.

Dedicatoria

A mi familia:

A ustedes que han estado conmigo, que me han apoyado, lo cual me ha permitido no rendirme, de manera que quiero plasmar mi gratitud en las siguientes palabras.

Dedico este trabajo a ustedes que con su apoyo constante me permitieron superarme cada día y hasta terminar esta etapa, la culminación de este trabajo es el resultado de varios años de dedicación. Siendo una etapa importante para mí esperando recompensar su sacrificio y palabras de ánimo.

A mi madre que siempre me ha demostrado el seguir adelante y cumplir tus objetivos, en verdad gracias.

A mis hermanos, tíos, primos por siempre estar conmigo y apoyarme, en cada momento.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN	14
Virus del Dengue.....	14
a) Genoma viral.....	14
b) Partícula viral.....	15
c) Proteínas virales.....	15
d) Replicación viral.....	17
Vectores del Dengue.....	19
Medidas contra el vector.....	20
Epidemiología.....	21
Epidemiología del dengue en México.....	22
Síntomatología y Diagnóstico de la infección por DENV.....	24
Vacunas contra la infección por DENV.....	25
ANTECEDENTES.....	28
HIPÓTESIS.....	46
JUSTIFICACIÓN	47
OBJETIVOS	48
Objetivo general.....	48
Objetivos particulares.....	48

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	49
METODOLOGÍA.....	50
Cultivo celular.....	50
Infección de las células Huh-7 con DENV.....	50
Extractos de RNA total.....	51
RT-qPCR para la detección del genoma viral.....	51
Inmunofluorescencia para la detección de YME1L1 y la proteína viral NS1 en células Huh-7.....	54
Clonación de sh-YME1L1 y sh-Scrambled en pSilencer 5.1 U-6 Retro.....	55
PCR de colonia.....	57
Transfección del plásmido pSH-YME1L1 y pSH-SCRAMBLED.....	57
Análisis Estadístico.....	58
RESULTADOS.....	59
Determinación de la expresión del gen YME1L1 en células Huh-7 infectadas con DENV2.....	59
Construcción del plásmido pSH-YME1L1 para el silenciamiento de la proteína YME1L1.....	68
Silenciamiento de la proteína YME1L1 mediante shRNA en células Huh-7.....	71
Efecto del silenciamiento de YME1L1 en la infección por DENV.....	74
DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXO I.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1. Representación del genoma viral de DENV.
- Fig. 2. Representación esquemática de la poliproteína de DENV.
- Fig. 3. Entrada del DENV a la célula mediante endocitosis mediada por receptor.
- Fig. 4. Representación del ciclo de transmisión de DENV selvático y urbano.
- Fig. 5. Gráfica de los casos registrados por DENV en el continente americano los últimos 5 años y por separado para 2023 y 2024.
- Fig. 6. Incremento de casos de DENV para el año 2024, tomando como comparación los datos registrados para 2023 y en los últimos 5 años, para las regiones de Centroamérica, México, Caribe, Andina y Cono Sur
- Fig. 7. Casos probables y confirmados de infección por DENV en México durante 2023 y 2024.
- Fig. 8. Esquema general del proceso de mitofagia.
- Fig. 9. Funciones moleculares de los genes potencialmente modulados por miRNAs en la infección por dengue. Análisis realizado con PANTHER.
- Fig. 10. Procesos biológicos de los genes potencialmente modulados por miRNAs candidatos identificados en la infección por dengue. Análisis realizado con PANTHER.
- Fig. 11. Vías implicadas de los genes potencialmente modulados por miRNAs candidatos identificados en la infección por dengue. Análisis realizado con PANTHER.
- Fig. 12. Representación de las metaloproteasas AAA.
- Fig. 13. Estrategia Experimental

Fig. 14. Mapa del vector pSilencer 5.1- U6 Retro.

Fig. 15. Amplificación de una región del genoma viral que codifica para la proteína NS5 de DENV a partir de células infectadas.

Fig. 16. Amplificación del RNAm de *YME1L1* por RT-PCR.

Fig. 17. Expresión relativa de *YME1L1* en células Huh-7 no infectadas e infectadas, MOI de 0.1.

Fig. 18. Expresión relativa de *YME1L1* en células Huh-7 no infectadas e infectadas, MOI de 1.

Fig. 19. Detección de la proteína NS1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 0.1.

Fig. 20. Detección de la proteína NS1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 1.

Fig. 21. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 0.1.

Fig. 22. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 1.

Fig. 23. Verificación mediante PCR de pSH-YME1L1.

Fig. 24. Verificación mediante PCR de pSH-SCRAMBLED.

Fig. 25. Alineamiento de la secuencia obtenida y esperada para pSH-YME1L1.

Fig. 26. Alineamiento de la secuencia obtenida y esperada para pSH-SCRAMBLED.

Fig. 27. Expresión relativa de *YME1L1* en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1.

Fig. 28. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células transfectadas con pSH-YME1L1.

Fig. 29. Expresión relativa del genoma viral en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas con DENV-2.

Fig. 30. Expresión relativa de *YME1L1* en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas con DENV-2.

Fig. 31. Detección de la proteína NS1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas con DENV-2.

Fig. 32. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas con DENV-2.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con dengue grave.

Tabla 2. Blancos putativos resultantes de la red de interacción de los 25 miRNAs modulados en pacientes con dengue grave según el programa miRNet.

Tabla 3. Asociación entre la expresión de miRNAs reprimidos y la de sus blancos putativos en pacientes con dengue grave.

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
cGAS	GMP-AMP cíclico sintasa
DENV	Virus del Dengue
DENV-1	Virus del Dengue tipo 1
DENV-2	Virus del Dengue tipo 2
DENV-3	Virus del Dengue tipo 3
DENV-4	Virus del Dengue tipo 4
DHF	Dengue hemorrágico febril
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRP1	Proteína relacionada con la dinamina 1
dsRNA	RNA de doble cadena
FIS1	Proteína de fisión mitocondrial 1
HUH-7	Línea celular de carcinoma hepatocelular humano
IFN	Interferón
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
kDa	Kilodaltones
MAVS	Proteína de señalización antiviral mitocondrial
MDA5	Proteína 5 asociada al melanoma
MFF	Factor de fisión mitocondrial
MNF1	Mitofusina 1
MNF2	Mitofusina 2
mtDNA	DNA mitocondrial
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κB
NS1	Proteína no estructural 1
NS2A	Proteína no estructural 2A
NS2B	Proteína no estructural 2B
NS3	Proteína no estructural 3

NS4A	Proteína no estructural 4A
NS4B	Proteína no estructural 4B
NS5	Proteína no estructural 5
OMA1	Metaloendopeptidasa mitocondrial
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA1	GTPasa mitocondrial similar a dinamina
PARKIN	Proteína Parkina
PINK1	Quinasa 1 inducida por PTEN
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
Proteína C	Proteína de cápside
Proteína E	Proteína de envoltura
Proteína M	Proteína de membrana
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
RdRP	RNA polimerasa dependiente de RNA
RIG-I	Gen Inducible por ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _r	RNA ribosomal
ssRNA	RNA de simple cadena
TRAF	Receptores de factores de necrosis tumoral
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UTR	Región no traducida
VHC	Virus de la Hepatitis C
YME1L1	Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP
ZIKV	Virus del Zika

RESUMEN

La infección por dengue desencadena una serie de modificaciones celulares entre los que se destacan cambios importantes en la función mitocondrial. Las mitocondrias son organelos celulares que intervienen de manera importante en procesos tales como el metabolismo, la respuesta inmune, estrés oxidativo, muerte celular, entre otros. En el presente trabajo nos enfocamos en el estudio de una metaloproteínasa de membrana interna mitocondrial llamada YME1L1 cuya función está relacionada con la dinámica y morfología mitocondrial así como con el procesamiento y translocación de proteínas en la mitocondria. Reportes previos indican que la expresión de YME1L1 se modifica durante la infección por dengue por lo que decidimos investigar los efectos de la inhibición de dicha proteína en la infección por este virus. Primeramente se determinaron los niveles de expresión de YME1L1 en células infectadas con dengue mediante RT-qPCR e inmunofluorescencia. Enseguida se establecieron las condiciones para el silenciamiento de YME1L1 mediante shRNA y posteriormente se llevaron a cabo ensayos de infección con el virus del dengue. Los efectos del silenciamiento de esta proteína en la infección se determinaron mediante RT-qPCR del genoma viral e inmunofluorescencia de la proteína viral NS1. Los resultados obtenidos indican que la inhibición en la expresión de YME1L1 aumenta la replicación viral por lo que se sugiere que esta proteína induce cambios en las funciones mitocondriales que modulan la infección, enfatizando con esto la importancia de la respuesta mitocondrial ante la infección por dengue.

INTRODUCCIÓN

Virus del Dengue

El virus del dengue (DENV) es un arbovirus perteneciente a la familia *Flaviviridae* y al género *Orthoflavivirus* que circula de manera endémica en nuestro país así como en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, el cual es transmitido por mosquitos, estos artrópodos también se conocen como vectores, ya que este es el medio para la transmisión del virus siendo *Aedes Aegypti* y *Aedes Albopictus* los principales vectores de la enfermedad. Entre los arbovirus existen diversos virus que son importantes para la salud pública en México, entre ellos se encuentra el virus del Dengue (DENV), el virus del Zika (ZIKV), el virus de Chikungunya (CHIKV), así mismo la existencia de otros arbovirus como el virus del West Nile (WNV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), entre otros.

El DENV se divide en 4 tipos, los cuales son dengue tipo 1 (DENV-1), dengue tipo 2 (DENV-2), dengue tipo 3 (DENV-3) y dengue tipo 4 (DENV-4), los cuales están antigénicamente relacionados pero no confieren protección cruzada. Los tipos de DENV generalmente comparten de un 65 a 70 % de identidad entre sus secuencias de nucleótidos (Hwang et al., 2020).

a) Genoma viral

El genoma del DENV es un RNA de sentido positivo monocatenario de un tamaño aproximado de 11 kb con una región 5'-UTR (del inglés 'Untranslated Region'), seguido de una secuencia que codifica para una poliproteína la cual contiene las 3 proteínas estructurales (C, prM/M, E) y las 7 no estructurales del virus (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) y finalmente la región 3'-UTR (Fig. 1).

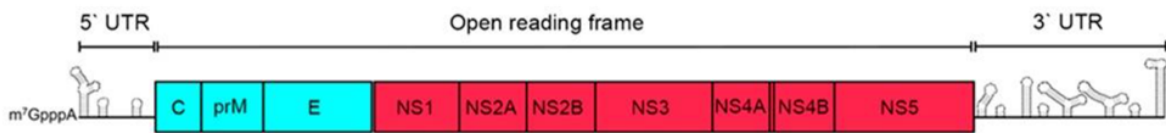


Fig. 1. Representación del genoma viral de DENV, en color azul se esquematizan las regiones que codifican para las proteínas estructurales (C, prM/M, E), en color rojo las regiones que codifican para las proteínas no estructurales (NS1 a NS5) así mismo se representan las regiones 3' y 5' no traducidas (UTR). Imagen tomada y modificada de (Barrows et al., 2018).

b) Partícula Viral

El DENV tiene un tamaño aproximado de 50 nm, teniendo una nucleocápside de 30 nm de diámetro de forma icosaédrica cubierta de una envoltura lipídica de unos 10 nm de profundidad. La conformación del virus la otorgan 3 proteínas importantes que constituyen la estructura del virión, y estas son la proteína M (Membrana), la proteína E (envoltura) y la proteína C (cápside) (Henchal & Putnak, 1990).

c) Proteínas Virales

Las proteínas codificadas por el genoma del DENV son de dos tipos, las estructurales que forman parte del virión y las no estructurales que juegan un papel importante en la replicación viral (Fig. 2).

Las proteínas estructurales son:

La proteína C o cápside que tiene un peso aproximado de 11 kDa, siendo rica en residuos de lisina y arginina lo cual puede asociarse a su carácter básico y le puede conferir la interacción con el RNA del virión. En el extremo carboxi terminal de esta proteína hay un tramo hidrofóbico que pudiera actuar como un anclaje transmembrana a temporal para interaccionar con la forma inmadura de la proteína M o prM, posteriormente se escinde el dominio hidrofóbico y se madura el virión (Barrows et al., 2018; Henchal & Putnak, 1990).

La proteína prM/M, en su estado inmaduro tiene un peso de 26 kDa y al sufrir una escisión mediante una proteasa celular conocida como furina, la cual se encuentra en el aparato de Golgi, permite generar la proteína madura M con un peso de 8 kDa (Harapan et al., 2020).

La proteína E tiene un peso de 53 kDa y sirve como una proteína de fusión de membrana que permite la unión y fusión del virus a la membrana celular. Esta proteína se conforma por homotrímeros en la superficie de los viriones, y posee 3 dominios estructurales llamados D-I, D-II y D-III. El D-I se ubica en el centro y tiene una forma de barril beta, D-II tiene una región rica en glicina la cual participa en la fusión del virus a la célula, en el caso de D-III se piensa que podría participar en la neutralización de los anticuerpos, así mismo esta tiene una estructura similar a las inmunoglobulinas, el cual ha sido asociado como causante de la virulencia y tropismo celular del DENV (Barrows et al., 2018; Harapan et al., 2020; Henschal & Putnak, 1990).

Las proteínas no estructurales son las siguientes:

La proteína NS1 es una proteína de 46 kDa que participa en el complejo de replicación viral así como en la inhibición de la activación del complemento. Esta proteína se sintetiza como un monómero para ser secretada con una conformación hexamérica. Los niveles altos de NS1 en pacientes con dengue se han asociado con las fases clínicas graves de la enfermedad (Barrows et al., 2018; Harapan et al., 2020).

La proteína NS2 está conformada por dos subunidades, NS2A de 22 kDa y NS2B de 14 kDa. La proteína NS2A es un factor importante en el complejo de replicación; en el caso de NS2B se asocia a la proteína NS3 para formar un complejo que funciona como proteasa viral (Barrows et al., 2018; Harapan et al., 2020).

La proteína NS3 tiene un peso molecular de 70 kDa que cumple dos funciones importantes: forma un complejo NS2B-NS3 que lleva a cabo funciones de proteasa para hidrolizar la poliproteína viral, así mismo participa en la replicación viral mediante otra función que es la de helicasa y ARN trifosfatasa importante en la

formación de la 5'Cap del genoma del DENV mediante la formación del complejo NS3-NS5 (Barrows et al., 2018; Harapan et al., 2020).

La proteína NS4 también está conformada por 2 subunidades las cuales son NS4A teniendo un peso de 16 kDa y NS4B de 27 kDa, donde NS4A induce cambios en la membrana celular que benefician la replicación del genoma; NS4B en conjunto con NS3 participan en el proceso de replicación viral (Nasar et al., 2020).

La proteína NS5 tiene un peso molecular de 104 kDa siendo la proteína con las regiones más conservadas del virus. Esta proteína cumple una función importante en el proceso de replicación viral donde funge como RNA Polimerasa dependiente de RNA (RdRP) así como un dominio de metiltransferasa donde se realizan los procesos de síntesis de la 5'CAP (Harapan et al., 2020; Nasar et al., 2020).

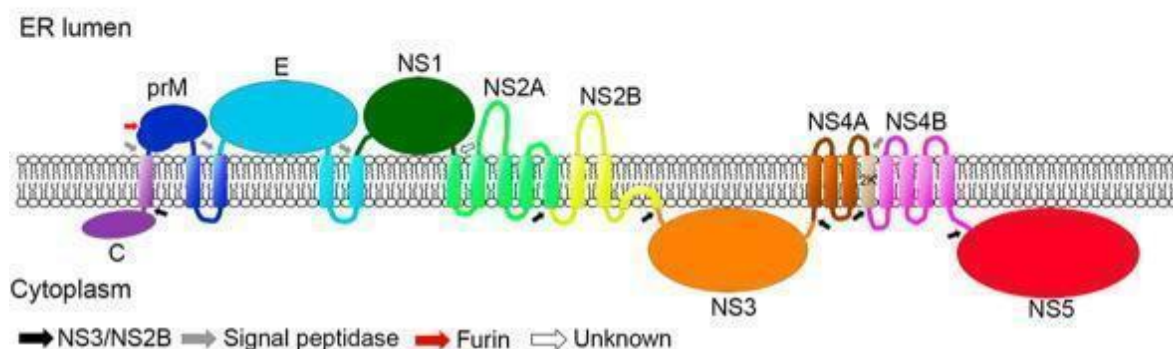


Fig. 2. Representación esquemática de la poliproteína de DENV. En la imagen se señalan con flechas las regiones donde se realiza el corte por parte de las proteasas (viral y celulares). Imagen tomada y modificada de Barrows et al., 2018.

d) Replicación viral

La infección comienza con la picadura del mosquito vector infectado, el cual al alimentarse deposita al virus en la dermis y epidermis del hospedero para comenzar con su ciclo de replicación. El virus primeramente debe de reconocer el receptor de la célula huésped a través de la proteína viral E, esto induce la endocitosis mediada por receptor en donde el aumento del pH en los endosomas provoca un cambio conformacional de la envoltura viral lo cual conduce a la fusión de la membrana

endosomal con la envoltura viral. Lo anterior promueve la liberación del genoma viral en el citoplasma celular comenzando con dos procesos importantes, la replicación y traducción de las proteínas virales para comenzar con la reproducción de la nueva progenie viral. El genoma viral es de carácter positivo por lo que funciona de manera directa como un RNAm, el cual puede ser traducido directamente, donde por medio del complejo de traducción se reconoce la secuencia y permite que inicie la síntesis de la poliproteína viral, la cual contiene las proteínas estructurales y no estructurales del virus. Esta poliproteína puede ser procesada por proteasas virales así como proteasas celulares, donde NS2B-NS3 forman la proteasa viral la cual escinde a la proteína C, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, las demás proteínas son procesadas por proteasas celulares. El procesamiento por la furina juega un papel importante en el aparato de Golgi la cual permite la maduración de la proteína M, este proceso de traducción y procesamiento de la poliproteína es importante para generar los nuevos viriones que serán expulsados mediante exocitosis y continuar su ciclo de infección, la segunda función del genoma viral es la de replicarse, donde este sirve como molde para la generación de un intermediario de RNA de sentido negativo, el cual por medio de las proteínas no estructurales (NS5, NS2A, NS4A/b, NS1 y NS3) y proteínas celulares generan el complejo de replicación, lo cual permite generar nuevas copias del genoma y que este sea empaquetado generando la nueva progenie viral, las cuales serán liberadas mediante exocitosis (Fig. 3)(Barrows et al., 2018).

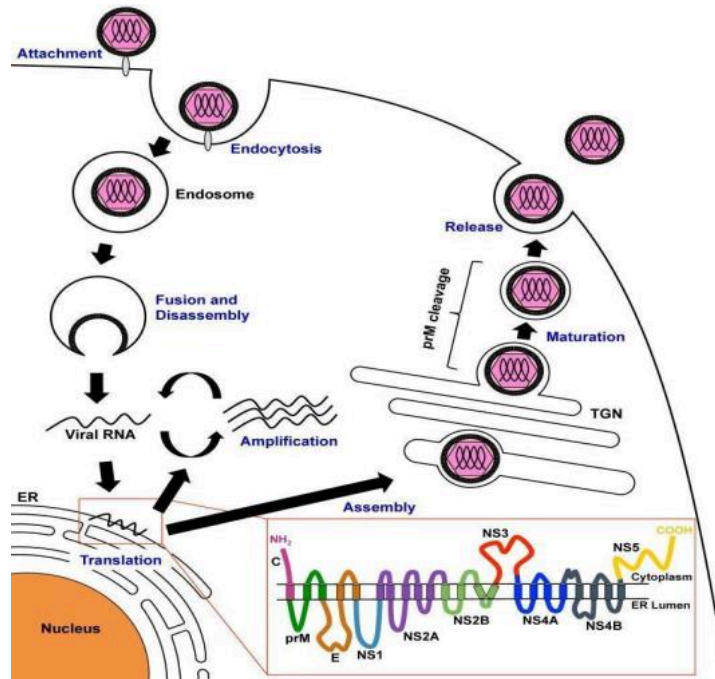


Fig. 3. Entrada del DENV a la célula mediante endocitosis mediada por receptor, representación del proceso de replicación y liberación de la progenie viral mediante exocitosis. En el recuadro de la derecha se esquematiza la poliproteína viral. Imagen tomada de Kato & Hishiki, 2016.

Vectores del Dengue

El DENV es transmitido por medio de mosquitos, siendo los principales vectores los del género *Aedes*, específicamente *Aedes Aegypti* y *Aedes Albopictus*, los cuales están distribuidos en todo el mundo, pero siendo las zonas tropicales y subtropicales en donde hay mayor presencia de estos. Las hembras transmiten la enfermedad, siendo los meses de lluvia, los ideales para la reproducción del vector y la propagación de la enfermedad. La transmisión del virus a los humanos ocurre por la picadura de un mosquito infectado, esto sucede cuando el mosquito se alimenta a través de su probóscide mediante la que inyecta la saliva, lugar en donde hay una abundante cantidad de virus infecciosos, en la piel del humano, y así se inicia la infección en este hospedero. El ciclo infeccioso se puede completar cuando una persona infectada con este virus presenta viremia (infección aguda) y es picado por otro mosquito. El mosquito al ingerir los virus que se encuentran en la sangre de la persona infectada, estos llegan a su intestino y después de un periodo de incubación

de aproximadamente 10 días, los virus se alojarán en las glándulas salivales del mosquito y serán capaces de iniciar de nuevo el ciclo infeccioso. Asimismo, se han descrito vectores que participan en el ciclo selvático de vida del virus como lo son *Aedes Luteocephalus*, *Aedes Furcifer* y *Aedes Taylori* los cuales infectan primates no humanos (Fig. 4)(Harapan et al., 2020).

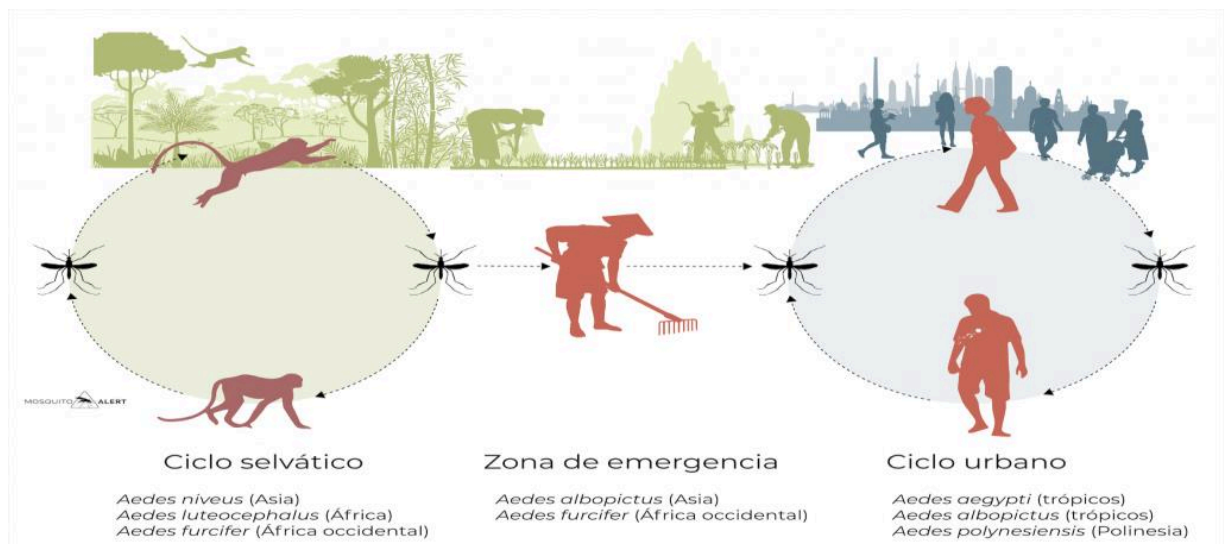


Fig. 4. Representación del ciclo de transmisión de DENV selvático por *Ae. Niveus*, *Ae. Luteocephalus*, *Ae. Furcifer* y el ciclo de transmisión urbano por *Ae. Aegypti*, *Ae. Albopictus* y *Ae. Polynesienses*. Imagen tomada de <http://www.mosquitoalert.com/dengue/>.

Medidas para prevención de la infección por DENV

El uso de medidas que puedan mitigar la reproducción del vector es muy importante para evitar la diseminación del virus evitando posibles brotes, entre estas se invita a la población general a evitar tener recipientes con agua a la intemperie los cuales pueden servir como medio de reproducción del vector o en su caso tener tapados estos recipientes de agua. Otra de las medidas es usar ropas largas que cubran la mayor parte del cuerpo, el uso de mosquiteros en las viviendas, también el uso de repelentes. En el caso del uso de insecticidas se recomienda que el gobierno implemente un calendario de fumigación donde los insecticidas utilizados sean

cambiados o no utilizados regularmente lo cual puede evitar que el vector genere resistencia a estos (López-Solís et al., 2020).

Epidemiología

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud para diciembre de 2024 se habían registrado un total de 6,784,079 casos confirmados de DENV lo cual representa un incremento del más del doble de casos probables que se tenían en las mismas fechas para 2023 (Fig. 5) (Organización Panamericana de la Salud, 2024).

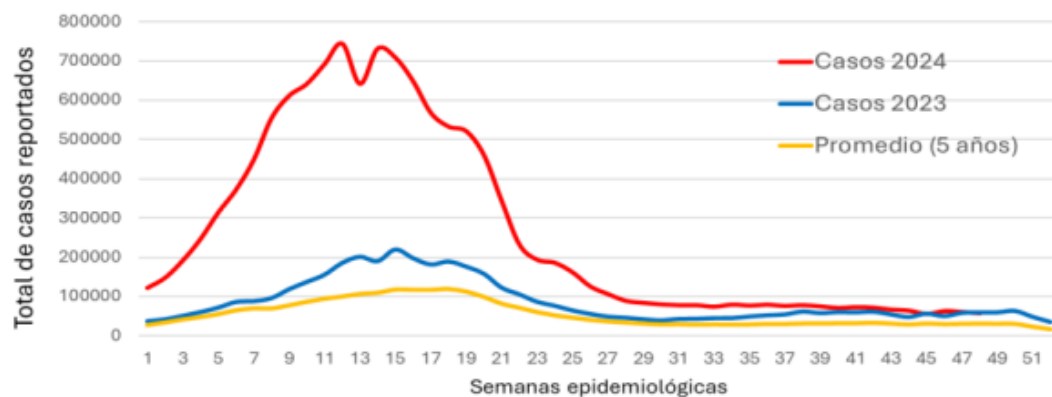


Fig. 5. Gráfica de los casos registrados por DENV en los últimos 5 años y por separado para 2023 y 2024. Imagen tomada de la Organización Panamericana de la Salud, 2024.

Así mismo, se observa un aumento de los casos en 2024 en comparación con los registrados en 2023 en las diferentes subregiones del continente americano: subregión de Centroamérica y México, subregión Caribe, subregión Andina y subregión Cono Sur (Fig. 6).

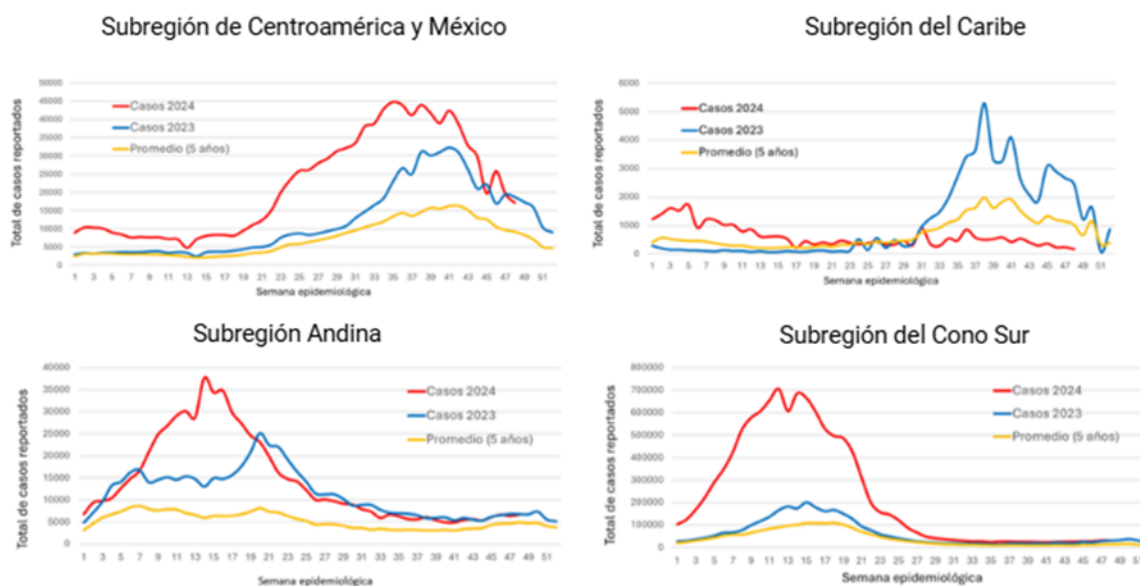


Fig. 6. Incremento de casos de DENV para el año 2024, tomando como comparación los datos registrados para 2023 y en los últimos 5 años, para las regiones de Centroamérica, México, Caribe, Andina y Cono Sur. Imagen tomada y modificada de la Organización Panamericana de la Salud, 2024.

Epidemiología del dengue en México

El DENV representa un riesgo para la salud humana y en México se tienen registros de infecciones por este virus, pues desde 1941 se notificaron 6955 casos siendo estos los primeros reportes registrados en el país. Una de las medidas que han resultado exitosas disminuyendo el número de casos es la aplicación de insecticidas para disminuir la población del vector *Aedes* que en ciertas épocas ha sido más exitosa que en otras. En 1978 se reportó en México la circulación del DENV-1, en 1980 se identificó el DENV-4, en el 1981 el DENV-2 y por último en 1995 el DENV-3. En 1984 se reportó el primer caso de fiebre hemorrágica por DENV (DHF) en México siendo este asociado al tipo 4 (Torres-Galicia et al., 2014).

En México se han presentado diversos brotes epidémicos de DENV como el del año 1980 en el cual se presentaron un total de 51,406 casos principalmente ocasionados por DENV-1; en 1997 donde se presentaron 53,541 casos donde DENV-3 fue el tipo más prevalente, de los cuales 980 fueron DHF. El tercer brote epidémico registrado

fue en el 2007, en el cual se registraron 52,369 casos, siendo 9,433 DHF y por último el cuarto brote epidémico ocurrió en 2009 con un registro de casos de 55,961 de los cuales 11,396 correspondían a DHF, siendo en estos dos últimos brotes provocados principalmente por DENV-1 y DENV-2 (Torres-Galicia et al., 2014). En el año 2023 en México ocurrió un aumento en el número de casos de dengue en comparación con 2022. En ambos años los tipos circulantes predominantes fueron DENV-2, DENV-3 y DENV-1, siendo DENV-2 el que tuvo mayor prevalencia en 2022, mientras que en el año 2023 DENV-3 desplazó a DENV-2 como el tipo más prevalente en la población, En el 2024 el número de casos para dengue incrementó drásticamente teniendo en la semana 52 de 2024 un total de casos confirmados de 125,160, mientras que en 2023 para esa misma semana se reportaron un total de 54,406 casos (Fig. 7). Al igual que en 2023 el tipo circulante más prevalente en el 2024 fue DENV-3 lo cual pudiese estar relacionado con el aumento de casos (SINAVE, 2024).

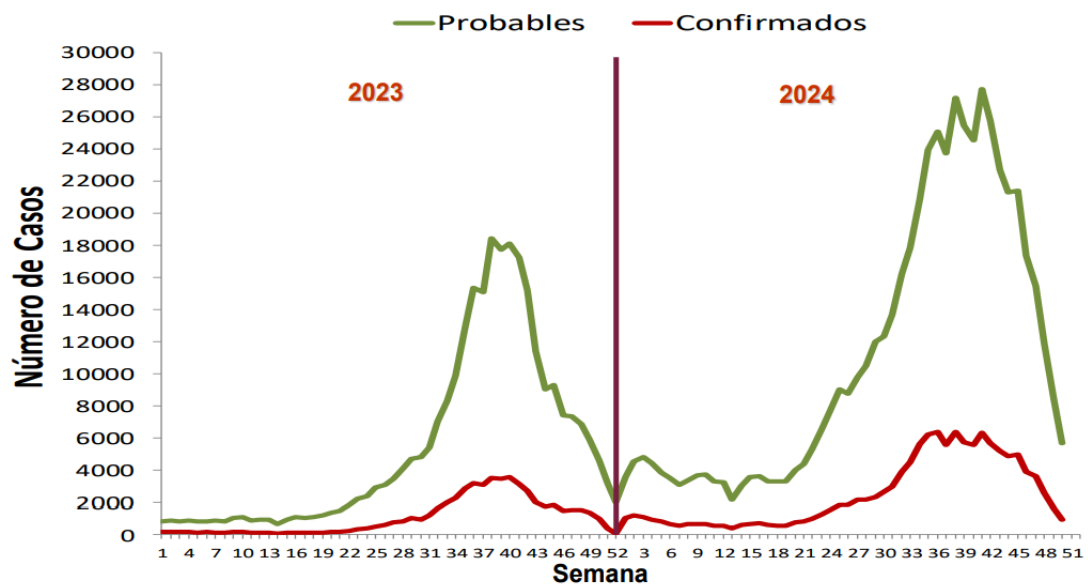


Fig. 7. Casos probables y confirmados de infección por DENV en México durante 2023 y 2024. Imagen tomada de SINAVE, 2024.

Sintomatología y diagnóstico de la infección por DENV

El DENV es un importante problema de salud pública en México, sin embargo el diagnóstico es complicado pues la sintomatología puede asemejarse a la de otras enfermedades. Las manifestaciones clínicas del DENV van desde una sintomatología leve parecida a la gripe, lo cual dificulta el diagnóstico, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado y compartido un sistema de clasificación de las infecciones ocasionadas por este virus cuya última actualización fue en el 2009. Con esta clasificación se establece que se dé prioridad a la atención clínica a individuos que presentan o puedan presentar una fase grave de la enfermedad.

La clasificación de la enfermedad es la siguiente:

Dengue sin signos de alarma: En este se presentan síntomas como fiebre, acompañado de cualquiera de los síntomas como cefalea, náuseas, dolor de ojos, dolor abdominal, etc. En este caso los pacientes solo son monitoreados desde casa ya que no es necesaria la hospitalización.

Dengue con signos de Alarma: Donde los síntomas principales son dolor abdominal, vómitos frecuentes, hemorragia, disminución en el número de plaquetas, acumulación de líquidos o en su caso presentar condiciones de riesgo tales como el embarazo, la edad, enfermedades crónicas, pacientes con antecedentes de infección con dengue, etc. El paciente que presente estos síntomas clínicos debe ser remitido a vigilancia hospitalaria por los riesgos de desarrollar enfermedad grave.

Dengue grave: Donde la sintomatología se asocia con complicaciones que pueden poner en riesgo la vida del paciente, tal es el caso del choque por extravasación del plasma, acumulación de líquidos, los cuales pueden dificultar la respiración, taquicardia, crisis convulsivas, vasoconstricción, hemorragia grave; así mismo se pueden generar afectaciones en los órganos como el hígado, cerebro, corazón; debido a la manifestación de estos síntomas el paciente deberá ser internalizado obligatoriamente y ser observado constantemente debido al riesgo de muerte (OMS, 2009, 2018).

A pesar de ser un problema de salud pública tan importante en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo aún no se tienen medicamentos antivirales específicos y efectivos contra esta infección. Por otro lado, es urgente la búsqueda de biomarcadores que eficientemente permitan diagnosticar el riesgo de enfermedad grave por DENV en fases tempranas de la enfermedad.

Los tratamientos y cuidados clínicos de los enfermos varían de acuerdo con la situación en la que se encuentre el paciente, siendo entre los más importantes el restablecimiento de líquidos mediante cristaloides, la transfusión de sangre, realización de hemograma, evaluación de posibles daños en órganos, entre otros (OMS, 2009, 2018).

Vacunas contra la infección por DENV

A pesar de que existen iniciativas de investigación para el descubrimiento de compuestos antivirales para la infección con DENV aún no se tiene ningún medicamento aprobado para su uso en humanos. Por otro lado, tampoco existe una vacuna 100% eficaz contra esta infección, aunque éstas pueden ayudar de cierta manera a combatir las infecciones por DENV, especialmente las graves, en poblaciones susceptibles o regiones endémicas de la enfermedad.

Existen 2 vacunas aprobadas para su uso en humanos: Dengvaxia (CYD-TDV) de Sanofi Pasteur y Qdenga (TAK003) del laboratorio Takeda de origen japonés.

Dengvaxia es elaborada por la farmacéutica Sanofi Pasteur, aprobada en México por COFEPRIS en 2015, es una vacuna tetravalente teniendo una eficacia aproximada del 70% contra la infección por DENV. De manera individual la eficacia contra cada tipo es para DENV-1 un 50.3%, DENV-2 42.3%, DENV-3 74% y DENV-4 77%. Así mismo se ha observado que la vacunación disminuye el porcentaje de pacientes que llegan a la unidad de cuidados intensivos (UCI) o la muerte ; en el caso de pacientes seropositivos a este virus el porcentaje de eficacia es del 83.7 % mientras que en pacientes seronegativos es del 43.2 % (M. F. Lee et al., 2025). Es importante que la administración de la vacuna sea dirigida hacia individuos seropositivos ya que en

individuos seronegativos las complicaciones de hospitalización podrían aumentar, debido a reacciones cruzadas con los anticuerpos generados por la vacunación lo que puede favorecer una enfermedad grave, debido al fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE). El ADE se describe como el efecto de los anticuerpos hacia una protección limitada debido a los diferentes tipos del DENV, lo cual puede favorecer la entrada de los viriones hacia el hospedero, por medio de estos anticuerpos en concentración subneutralizante que se unen al virus, pero que no lo neutralizan. Esto favorece una mayor infección hacia las células inmunitarias, lo cual podría conducir a un aumento en las complicaciones durante la infección por DENV probablemente por mayor carga viral (Aynekulu Mersha et al., 2024).

Esta vacuna está elaborada con virus atenuados de los 4 tipos de DENV y en México se aplica en población de 9 a 45 años con tres aplicaciones en intervalos de 6 meses o en su caso la administración de las 3 dosis cada 20 días siempre y cuando se establezca un período flexible de vacunación, siendo este esquema de vacunación el mismo para individuos adultos como pediátricos. Es importante mantener la edad mínima de vacunación en 9 años debido a las posibles complicaciones que pueden presentar los pacientes de menor edad. En la población mexicana la eficacia de la vacuna después de 25 meses después de la primera inyección fue de 31.3%, esto se debe a que la eficacia de la vacuna varía dependiendo de los tipos circulantes en los países, siendo al momento de ese estudio los tipos 1 y 2 los más prevalentes en México, en tal caso que los virus circulantes sustituyeran a los tipos 1 y 2 por alguno de los tipos 3 o 4 la eficacia podría aumentar (Pando, 2023; Roche Registration GmbH, 2014).

Qdenga es la otra vacuna recientemente aprobada para su uso en humanos, la cual es fabricada por el laboratorio Takeda, y que ha sido recomendada para su uso por la OMS el 2 de octubre de 2023. A la fecha se encuentra aprobada en Tailandia, Islandia, Noruega, Malasia, la Unión Europea, Reino Unido, Brasil, Colombia y Argentina; en el caso de México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) aún no la ha aprobado.

La vacuna Qdenga al igual que Dengvaxia está elaborada con virus atenuados de los 4 tipos de DENV donde la eficacia varía dependiendo del tipo viral así para DENV-1 tiene una eficacia del 56.2%, para DENV-2 del 52.3%, para DENV-3 52.3% y para DENV-4 hasta 60.7%; la eficacia general contra el DENV es del 62% y presenta un 83.6 % de protección contra la hospitalización; la administración de la vacuna es por vía subcutánea en la región del deltoides. Esta vacuna se recomienda en pacientes a partir de 4 años de edad con dos dosis aplicadas separadas por 3 meses; otra de las ventajas de esta vacuna es que se puede administrar independientemente del estado serológico de los individuos con respecto a dengue ya que presenta una eficacia del 66.2 % para individuos seronegativos y del 76.1 % para seropositivos (M. F. Lee et al., 2025; Pando, 2023).

ANTECEDENTES

El DENV representa un problema de salud importante en la población mexicana ya que se registran un gran número de pacientes ambulatorios y hospitalizados en los cuales se confirma la infección por este patógeno, sin contar con los individuos con síntomas leves que no acuden a servicios médicos o los que cursan con una infección asintomática. Como se mencionó anteriormente aún se carece de medicamentos antivirales efectivos específicos y de herramientas diagnósticas predictivas de enfermedad grave por este virus. Por lo anterior, se considera de suma importancia conocer los factores celulares que inciden en el ciclo replicativo viral, elementos pro o antivirales en las células infectadas, los cuales podrían tener importancia como blancos para el desarrollo de posibles tratamientos, herramientas diagnósticas u otras estrategias vacunales.

El estudio del ciclo replicativo del virus en células humanas es una estrategia que se desarrolla para la búsqueda de factores que intervienen en la multiplicación del virus y que pudieran tener utilidad como parte de estrategias antivirales para ayudar en la lucha contra las infecciones por este virus, especialmente las que se acompañan de síntomas graves.

Uno de los organelos que sufre cambios importantes en las infecciones por virus y especialmente en la infección por dengue es la mitocondria cuya morfología, dinámica y función se modifican; estos cambios han sido relacionados con diversas actividades como estrés oxidativo, apoptosis, respuesta inmune, autofagia, metabolismo, entre otros. Todas las funciones descritas son muy importantes y podrían contribuir al éxito de la infección viral y la intervención en estos procesos podría ser útil para disminuir la patogénesis ocasionada por DENV especialmente en los casos graves.

La mitocondria es un organelo celular con un posible origen bacteriano, el cual tiene una morfología en forma de óvalo compuesta por 2 membranas, la membrana interna y externa. La función más conocida de la membrana interna es generar el ATP en la fosforilación oxidativa y la función de la membrana externa se caracteriza por su función como mediadora en el intercambio de moléculas.

En la matriz mitocondrial se llevan a cabo procesos como el ciclo de Krebs, la β -oxidación, regulación del estrés oxidativo, entre otros. La mitocondria es un orgánulo celular el cual tiene su propio DNA con una longitud de 16 kb de forma circular de doble cadena. Este DNA contiene 37 genes que codifican para 13 proteínas entre las que se encuentran las proteínas de la cadena transportadora de electrones, 2 RNAr y 22 RNAt importantes en los procesos de traducción (Elesela & Lukacs, 2021).

La dinámica mitocondrial permite regular la morfología, el tamaño, la cantidad y la distribución de estos organelos lo cual es necesario para mantener sus funciones bajo diferentes condiciones, por ejemplo cuando una mitocondria sufre algún tipo de daño que no le permite seguir con su función de manera normal se inducen cambios en la dinámica que podrían alterar los procesos de fusión y fisión, o permitir que suceda la mitofagia (proceso mediante el que se degradan las mitocondrias y se reciclan los elementos útiles para la célula) o la apoptosis.

Estos procesos se inician por medio de señales, las cuales pueden ser desde afectaciones en la membrana, modificaciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), el estrés oxidativo y las infecciones virales.

Una de las posibles respuestas de la mitocondria ante dichas señales es la fisión, proceso mediado por DRP1, FIS1 y MFF las cuales permiten la separación de la mitocondria, una de las secciones será eliminada y se degradará por encontrarse en mal estado y la otra parte se conservará y se fusionará con otra mitocondria funcional. La fusión permite que haya reciclaje mitocondrial y es mediado por las proteínas OPA1, MFN1 y MFN2. En el caso de que las señales de agresión celular o mitocondrial continúen se pueden activar los programas de mitofagia o apoptosis.

El $\Delta\Psi_m$ está muy relacionado con el nivel de generación de energía por los complejos de la membrana interna mitocondrial, por lo que se correlaciona con los niveles generados de ATP, si tenemos un nivel estable en la generación de energía el $\Delta\Psi_m$ se mantendrá de la misma manera, si la generación de energía sufre algún cambio entonces el $\Delta\Psi_m$ se verá afectado y esto a su vez puede iniciar el proceso de mitofagia (Fig. 8)(Elesela & Lukacs, 2021).

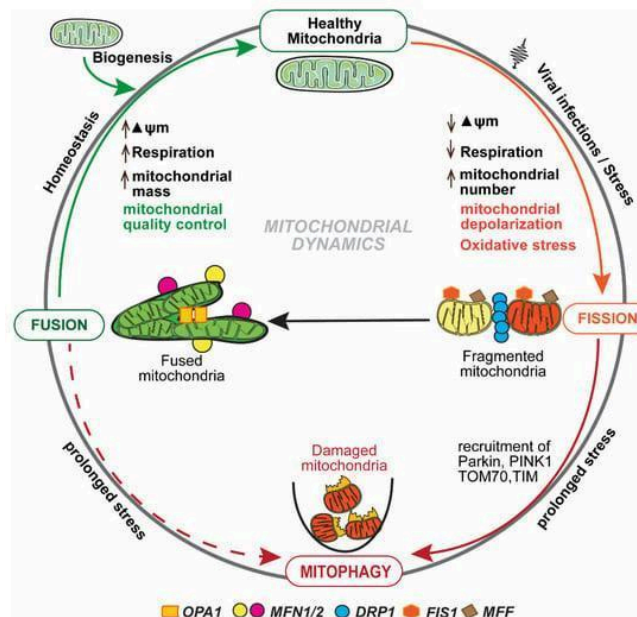


Fig. 8. Esquema general de los principales procesos de la dinámica mitocondrial. Imagen tomada de Elesela & Lukacs, 2021.

Los cambios generados por las infecciones virales en la mitocondria pueden provocar diferentes problemas que modifican los procesos de fusión y fisión, provocan cambios en la bioenergética mitocondrial, afectan a la respuesta inmune antiviral, aumentan el estrés oxidativo, modulan la apoptosis y la mitofagia.

La respuesta inmune tiene elementos que se relacionan con las mitocondrias, siendo una de las vías más caracterizadas la que se relaciona con el complejo MAVS (proteína de señalización antiviral mitocondrial), mtDNA (DNA mitocondrial) por cGAS/STING (GMP-AMP cíclico sintasa-estimulador de genes de interferón), y la respuesta por IFN (interferón) (Saito & Gale, 2008).

La respuesta antiviral puede comenzar por la activación de los receptores de tipo Nod (NLRs) y tipo toll (TLRs), donde los receptores TLR3 y TLR7, TLR8 no sólo reconocen secuencias dsRNA a nivel intracelular sino que también secuencias de ssRNA de patógenos externos, en el caso de los NLRs, NLRP3 puede reconocer a secuencias de ssRNA y dsRNA, para producir la respuesta antiviral.

MAVS es una proteína de membrana externa mitocondrial que es importante en la respuesta inmune ante infecciones virales como un receptor para transducir señales

por medio de la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). MAVS puede ser activado por RIG-I y MDA5, así como LGP2 el cual regula a los dos anteriores, donde estos identifican secuencias genómicas virales de dsRNA y ssRNA que no contengan 5'cap, sino una 5' ppp (Ren et al., 2020).

La activación de RIG-I y MDA5 se da por la detección de genomas virales con las características antes mencionadas, así estos factores interaccionan con MAVS, lo cual lleva a la activación de los reguladores de interferón IRF3 e IRF7, así como la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, lo cual lleva a una respuesta por interferón (IFN) siendo estos importantes en la respuesta antiviral.

Los virus pueden inhibir, bloquear y degradar MAVS como una manera de evadir la respuesta inmune, por ejemplo la proteasa viral del virus de la hepatitis C, el virus de Seneca Valley, rinovirus C, entre otros, cortan a MAVS bloqueando la cascada de señalización para evitar que la vía lleve a la producción de los mediadores inmunes antivirales (Ren et al., 2020).

El virus de la hepatitis B, rotavirus, SARS-COV promueven la ubiquitinación de MAVS y su degradación, adicionalmente durante la infección por SARS-COV se promueve la degradación de DRP1, lo cual permite la regulación negativa del IFN (Ren et al., 2020).

La inhibición de la proteína MAVS puede provocar persistencia de la infección viral mediante la evasión de la respuesta inmune, tal es el caso de del virus sincitial respiratorio, el virus del Zika, citomegalovirus humano y el virus de la influenza A lo cuales pueden inhibir la respuesta mediada por MAVS mediante el bloqueo de RIG-I y MDA5; el virus de la Influenza A puede inhibir MAVS mediante la unión de la proteína viral PB1-F2 y PB2 a MAVS, lo cual también provoca la disminución del potencial de membrana mitocondrial (Ren et al., 2020).

La respuesta inmune mediada por MAVS en respuesta a la activación de RIG-I y MAD5 en contra de la infecciones virales da por resultado la expresión de los IFN tipo I, donde DENV puede inhibir a MAVS mediante la proteína viral NS4A la cual

afecta la interacción entre MAVS y RIG I, y genera una disminución en la respuesta antiviral (He et al., 2016).

El virus de influenza H5N1 puede inhibir MAVS mediante el uso de la proteína viral PB1-F2 lo cual se ve reflejado en una disminución de IFN; así mismo la proteína viral NS1 puede actuar como inhibidor de la producción de IFN, sin embargo se ha demostrado que por medio de la interacción de PB1-F2 con NS1 se puede favorecer una mayor inhibición en la expresión de IFN (Varga et al., 2011).

La célula tiene como último recurso durante una infección sufrir el proceso de apoptosis lo cual evita que un patógeno intracelular siga causando problemas, en este caso la apoptosis puede ocurrir a través de dos vías la extrínseca o la intrínseca, mediante la activación de proteínas conocidas como caspasas.

En el caso de la vía extrínseca la cual es independiente de P53, comienza por estímulos desde el exterior de la célula los cuales se unen a Apo2L, FASL que activan a DR4 y DR5 los cuales son receptores de muerte celular, y activan la vía de la caspasa-8 y la caspasa-3/7, resultando en la muerte celular apoptótica (Boland et al., 2021).

En el caso de la vía intrínseca también llamada vía mitocondrial, la cual cumple un papel importante en el proceso de activación de apoptosis, comienza principalmente por la proteínas BCL-2 y BAX/BAK; la activación de BCL-2 en conjunto con BAX/BAK regulan la expresión de proteínas proapoptóticas, la activación por BAX/BAK da por resultado la permeabilización de la membrana mitocondrial externa causando la formación de poros por los cuales se libera el citocromo C al citoplasma empezando con la formación del apoptosoma, donde la unión del citocromo C con el factor activador de proteasa apoptótica 1 (APAF1) activa a la Caspasa 9, la cual posteriormente activará a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 para iniciar con la apoptosis (Elesela & Lukacs, 2021).

La inhibición de la apoptosis permite a los virus un mayor tiempo de multiplicación en la célula, aumentar la progenie viral y con ello una mayor diseminación de la infección. Una de las estrategias utilizadas para dicho propósito es el mimetismo por

el cual algunos virus como poxvirus, herpesvirus, el virus vaccinia, etc utilizan genes que imitan a BCL2. Dichas proteínas mimetizadoras de BCL2 se unen a las proteínas proapoptóticas BAK/BAX y evitan que continúe la cascada apoptótica (Sorouri et al., 2022).

La activación de la vía cGAS/STING por exposición del mtDNA por la liberación del genoma mitocondrial mediante la vía apoptótica intrínseca activa la respuesta de IFN tipo I frente una infección viral.

El DENV puede activar la vía cGAS debido al daño mitocondrial que tiene como consecuencia la apoptosis y liberación del mtDNA el cual será reconocido por cGAS que activa a STING y a su vez induce la respuesta inmune mediada por IFN tipo I, aunque no se puede confirmar si la activación de cGAS se produce por la apoptosis intrínseca o por los posibles cambios morfológicos que sufre la mitocondria. Estos cambios pudieran permitir la liberación del mtDNA durante la infección por DENV en donde se reporta que se reduce la expresión de DRP1 (proteína de fisión mitocondrial) y provoca el alargamiento de la mitocondria, lo que correlaciona con la liberación del genoma mitocondrial al citosol (Sun et al., 2017).

El DENV puede regular la fusión mediante NS2B3, que es una proteína viral que funge como proteasa, esta puede cortar a MFN1 y MFN2, lo cual induce la inhibición de la fusión mitocondrial. Además se ha propuesto que MNF1 también funge como un posible mediador entre MAVS y la señalización por RLRs ya que al inhibir MFN1 se ve una disminución de IFN (Yu et al., 2015).

Otra proteína viral de DENV que puede estar afectando la dinámica mitocondrial es NS4B la cual se ha visto implicada en la modificación de la morfología mitocondrial ya que inhibe la activación de DRP1 y así a la fusión mitocondrial promoviendo el alargamiento de este organelo durante la infección viral y esto a su vez correlaciona con la disminución de la respuesta inmune antiviral mediada por RIG-I (Chatel-Chaix et al., 2016a).

El virus de Zika (ZIKV), otro virus perteneciente a los *Orthoflavivirus*, puede afectar también la dinámica mitocondrial pues la translación de la proteína viral NS4A promueve la fisión mitocondrial y la mitofagia. Por otro lado, se ha demostrado que

esta proteína tiene la capacidad de inhibir la respuesta de IFN mediada por MAVS (J. K. Lee & Shin, 2023).

En la infección por el virus Usutu (USUV), otro virus de la misma familia que DENV y que se transmite por artrópodos, se ha reportado que el bloqueo de MAVS por la proteína viral NS4A puede evitar la unión de MAVS con MDA5 ayudando al virus a evadir la respuesta inmune innata mediada por IFN tipo I; así mismo se ha demostrado que la interacción entre MAVS y NS4A se mantiene conservada en los flavivirus (DENV, JEV, YFV, WNV, ZIKV) lo cual promueve la evasión del sistema inmune (Nelemans et al., 2024).

El virus de la encefalitis japonesa (JEV), afecta la dinámica mitocondrial donde la proteína viral NS4A lleva a un incremento de DRP1 y de la fisión, lo cual podría tener un papel positivo en la replicación viral ya que el silenciamiento de DRP1 disminuye de manera importante el título viral. Por otro lado, se ha visto que esta proteína viral puede inducir la mitofagia mediante la vía PINK1/PARKIN y así evitar la apoptosis; y disminuir la expresión de MFN1 y 2 (Agarwal et al., 2022).

Los estudios realizados en las infecciones por diversos virus indican que las funciones y dinámica mitocondrial se ven afectadas ya que en este organelo celular se realizan procesos para la obtención de la energía, donde comienza el ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos, donde cambios en la producción de energía por parte de la mitocondria puede favorecer a la infección. Un ejemplo de esto lo encontramos en el citomegalovirus humano que favorece el aumento de algunos metabolitos del ciclo de Krebs como lo es el citrato y el malato, así como la síntesis de ácidos grasos lo cual podría promover la infección, en cambio se ha reportado que el virus de herpes simple favorece la síntesis de las pentosas fosfato en vez de la síntesis de ácidos grasos (Vastag et al., 2011).

La oxidación de ácidos grasos o β -oxidación ocurre en la matriz mitocondrial con lo que genera energía, en el caso de DENV se ha reportado que este aumenta la β -oxidación en células de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7.5) infectadas en comparación con células no infectadas (Heaton & Randall, 2010).

En el caso DENV, Singh y cols. reportaron que en líneas celulares humanas hepáticas, de pulmón y de riñón, este virus afecta la morfología y función

mitocondrial pues promueven el redondeamiento e hinchazón de estos organelos a las 48 horas post infección. También observaron que a las 60 h la red mitocondrial disminuye. Asimismo, se pudo observar un aumento en la generación de las especies reactivas de oxígeno a las 48 h post infección y se comprobó que NS4A y NS4B pueden inhibir la mitofagia y autofagia (Singh et al., 2022).

La revisión bibliográfica previa al presente trabajo nos llevó a centrar nuestro interés en las funciones de la mitocondria o las proteínas mitocondriales durante la infección por DENV ya que como se ha descrito, las funciones de este organelo son muy importantes en la respuesta intracelular a la infección y en la patogénesis ocasionada por este virus. Por lo anterior, la estrategia fué buscar reportes de miRNAs que pudieran estar modulando la expresión de proteínas mitocondriales importantes en las funciones de este organelo.

Así, primeramente nos dimos a la tarea de buscar los miRNAs que se habían reportado modulados en la infección por dengue, poniendo énfasis en el dengue grave. De esta manera se identificaron 31 miRNAs diferencialmente expresados en el suero de pacientes con dengue grave, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con dengue grave.

miRNAs	Regulación	Referencia
Hsa-mir-450b-5p	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-491-5p	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-499a-3p	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-615-5p	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-624-5p	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016

Hsa-mir-892b	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-1204	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-1225-5p	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-3121-3p	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-4259	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-mir-4327	Sobreexpresado	Tambyah et al., 2016
Hsa-miR-146a-5p	Sobreexpresado	Xie et al., 2021
Hsa-mir-6499	Sobreexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-122-5p	Sobreexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-486-5p	Sobreexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-92a-5p	Sobreexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-320a	Sobreexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-151b	Subexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-191-5p	Subexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-584-5p	Subexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-let-7e-5p	Subexpresado	Saini et al., 2020

Hsa-mir-92b-5p	Sobreexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-378a-5p	Sobreexpresado	Saini et al., 2020
Hsa-mir-149-3p	Sobreexpresado	Hapugaswatta et al., 2020
Hsa-let-7e	Sobreexpresado	Hapugaswatta et al., 2020; Masyeni et al., 2018
Hsa-mir-150	Sobreexpresado	Hapugaswatta et al., 2020; Chen et al., 2014
Hsa-mir-15a-3p	Subexpresado	Rajput et al., 2020
Hsa-mir-24-1-5p	Subexpresado	Rajput et al., 2020
Hsa-mir-512-5p	Subexpresado	Rajput et al., 2020
Hsa-mir-4640-3p	Subexpresado	Wong et al., 2020; Rajput et al., 2020; Tambyah et al., 2016.
Hsa-mir-383	Subexpresado	Rajput et al., 2020

*Las filas sombreadas no fueron consideradas por el programa miRNet para construir el interactoma.

Los miRNAs encontrados en la literatura se usaron para elaborar una red de interacción e identificar sus posibles blancos haciendo uso del programa miRNet (<https://www.mirnet.ca/>), basado de cuatro bases de datos bien caracterizadas como

miRTarBase v8.0, TarBase v8.0, miRecords y miRanda con la finalidad de identificar los posibles blancos de los mirnas incluidos en la tabla 1.

La red de interacción arrojó 175 genes potencialmente modulados por un conjunto de 25 miRNAs , los cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Blancos putativos resultantes de la red de interacción de los 25 miRNAs modulados en pacientes con dengue grave según el programa miRNet.*.

AGO2	XIAP	MAPK1	HNRNPUL1	PLSCR1	SLC7A5	TMEM245	UTP4
CTNNB1	PURB	FOXP1	TFDP2	TMC7	CRIP1	COPS8	ARL5C
ANXA11	PKM	ABL2	PPP1R10	TIAL1	EDEM3	TP53INP1	YME1L1
GLUL	ZNF451	KLHL15	SAR1A	MRPL17	SLC7A11	ACTB	RACGAP1
RBL1	CDKN1A	MECP2	NUP155	EGFR	FIGN	KCTD10	CACNG8
BTLA	GTF3C6	REL	CCND1	TMEM59	ALDOA	BMI1	VMA21
IGF2	PPIC	TNRC6A	UBTF	CD40LG	PHAX	ERGIC1	PDE12
BCL2L2	HOOK3	RHOA	HNRNPAA0	HSPA4L	SRCAP	FKBP1A	CDK6
MDM4	RNF11	DCP2	YWHAZ	DCTN5	NCBP3	CD46	DHX33
ABCF2	FADS6	BRAF	FAM241A	ABLIM1	VAV3	SERPINH1	ZNF699
NFIX	RAC1	SRF	CPM	QRFPR	IGF1R	NFASC	SOCS7
VEGFA	ZNF460	GDE1	VHL	ELAVL1	USP6NL	MAPK8	IFNAR1
ENTPD1	NPR1	BCL2L1	CDC25A	MLXIP	RPL24	GPI	DR1
MEF2D	CCND2	CSTF1	DSN1	FPR1	ATP13A3	SLC28A1	CALU
HEBP2	RFC1	BASP1	UBN2	SMAD2	RNF24	MRM3	TP53
LARP1	GATA6	SSR3	ZNF117	ROBO1	SUMO1	FOXO1	CXCL8
GTF3C4	SLC1A5	GNL3L	GPR75	ROCK1	LINC00598	H3F3B	FOXM1
IL1A	ZNF708	CALR	TMEM170A	SLPI	TSPYL1	LTBP2	NFIC
CADM1	RBM22	ARRB1	PLEKHM1	CASKIN1	HSPA5	IGFBP5	RPL41
SON	EREG	NR6A1	MAP3K9	PTGFRN	AKT2	AKR7A2	BCL7A
HIF1AN	RAD21	CDK4	DAZAP2	MSC	SP2	ECE1	FIBCD1
BCL7B	DDIT4	ABI2	MAZ	CLEC17A	ZNF260	TMEM231	

*Los genes están ordenados de mayor a menor número de posibles interacciones entre los miRNAs seleccionados y los RNAm que codifican dicha proteína.

La red de interacción de miRNAs realizada usando miRNet resulta en una serie de RNAm que podrían ser sujetos de regulación de los miRNAs. Por otro lado, se analizó la literatura con la finalidad de encontrar bases de datos en las que se establezca la expresión diferencial de genes asociados a la infección por dengue grave. Luego se buscó correlacionar el nivel de expresión de los miRNAs con la expresión de sus genes blanco, de tal manera que se encontraron una serie de miRNA sub-expresados que tienen como blancos putativos a 7 de los 10 genes y que a su vez se encuentran sobre-expresados en dengue grave son los siguientes: SLC7A, HSPA4L, YME1L1, SSR3, TIAL, NUP155, RACGAP1, MRPL17, RFC1, ERGIC1 (Tabla 3).

Tabla 3. Asociación entre la expresión de miRNAs sub-expresados y sus blancos putativos sobre-expresados en dengue grave*.

Proteínas sobreexpresadas	miRNAs subexpresados como moduladores potenciales
SLC7A5	hsa-mir-383-3p hsa-mir-24-1-5p
YME1L1	hsa-mir-383-3p hsa-mir-151b
SSR3	hsa-mir-383-3p
TIAL1	hsa-mir-512-5p
RACGAP1	hsa-mir-24-1-5p
RFC1	hsa-mir-512-5p
ERGIC1	hsa-mir-151b

*Información obtenida de Shah et al., 2018

Estos genes o miRNAs podrían ser concebidos como posibles blancos farmacéuticos o como elementos clave en la comprensión de los mecanismos moleculares utilizados por DENV especialmente en las infecciones graves.

Posteriormente, se realizó un análisis de los procesos relacionados con los genes potencialmente modulados por los miRNAs para lo cual se utilizó el sistema de clasificación PANTHER que se basa una base de datos de genes categorizados sobre la base de evidencia experimental y evolutiva (<https://pantherdb.org/>).

El análisis de función molecular, mostró que los 7 genes candidatos a blanco se clasifican principalmente en: actividad catalítica, actividad dependiente de ATP, unión, actividad regulatoria de función molecular, actividad transductora molecular y actividad transportadora (Fig. 9).

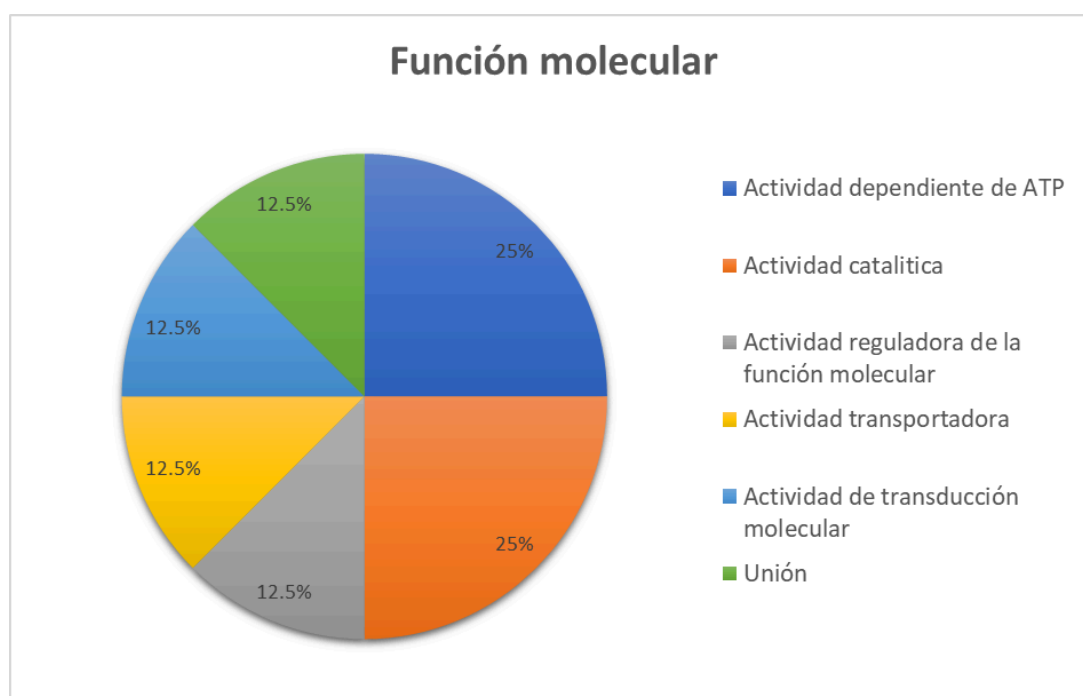


Fig. 9. Funciones moleculares de los genes potencialmente modulados por miRNAs en la infección por dengue. Análisis realizado con PANTHER.

Los resultados del análisis de los procesos biológicos muestran que los genes en cuestión están implicados en procesos celulares, respuesta a estímulos, procesos metabólicos, regulación biológica y localización (Fig. 10).

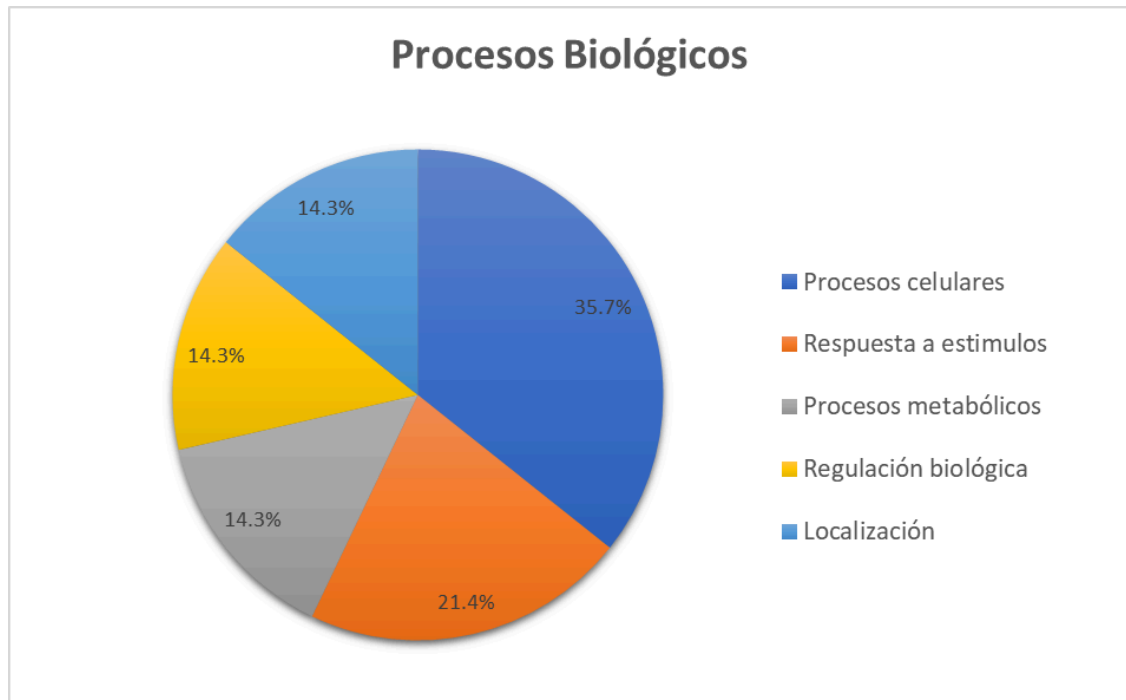


Fig. 10. Procesos biológicos de los genes potencialmente modulados por miRNAs candidatos identificados en la infección por dengue. Análisis realizado con PANTHER.

El análisis de las vías implicadas a partir de los genes seleccionados indica que se relacionan principalmente con: replicación de DNA y vías de señalización relacionadas con la proteína G heterotrimérica (Fig. 11).

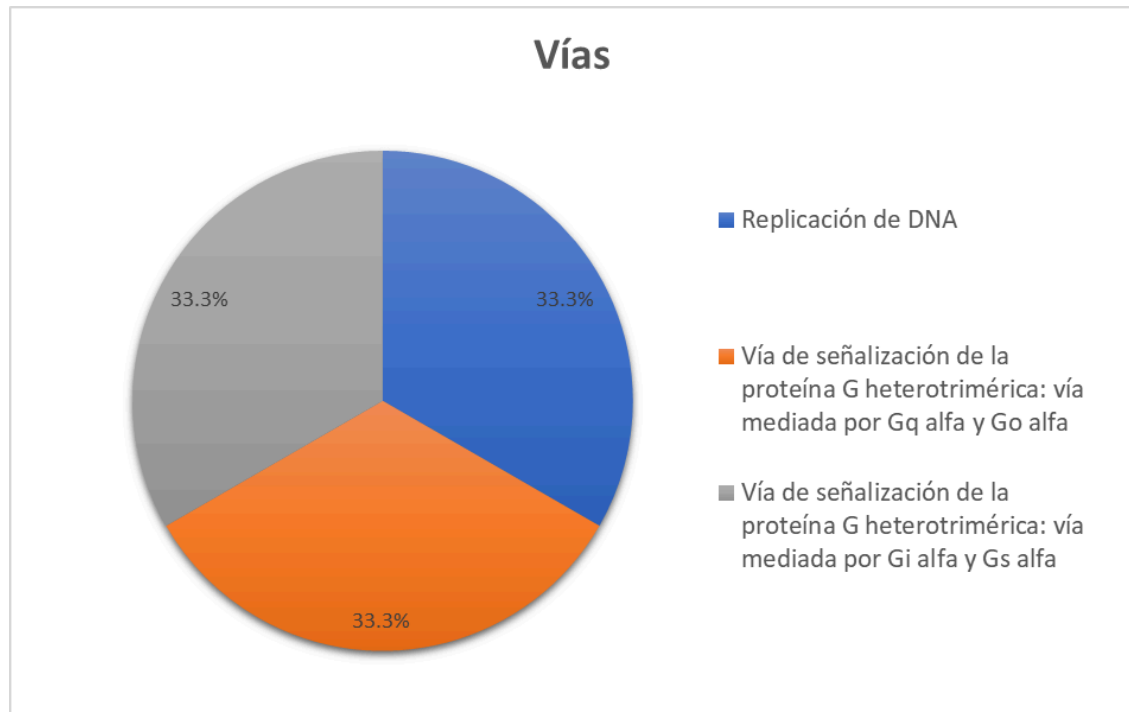


Fig. 11. Vías implicadas de los genes potencialmente modulados por miRNAs candidatos identificados en la infección por dengue. Análisis realizado con PANTHER.

Los resultados obtenidos sugieren que los miRNAs modulados durante el dengue grave podrían influir en el nivel de expresión de los 7 genes candidatos y por lo tanto en inducir cambios en diversas vías importantes para el funcionamiento celular. Enseguida se buscó información acerca de la función o cambio de expresión de estos factores proteicos en las condiciones de infección por flavivirus, arbovirus o específicamente dengue. En este contexto se encontraron los siguientes antecedentes:

SLC7A5: es una proteína que se sobreexpresa en las infecciones por DENV y ZIKV. La sobreexpresión de SLC75A en las infecciones por dengue promueve el agotamiento de triptófano lo que propicia la de grandes concentraciones de quinurenina (Bonezi et al., 2020). En este sentido se ha documentado que el agotamiento de triptófano puede inhibir la proliferación de linfocitos T (Hwu et al., 2000).

YME1L1: es una proteína mitocondrial que se reportó previamente en un estudio por Shah y colaboradores, en el 2028 como un factor sobreexpresado se encuentra sobreexpresado 1.6 veces en la infección por DENV pero no se tiene descrito alguna función de esta proteína asociada a este virus (Shah et al., 2018). Además esta proteína tiene la capacidad de incidir en la actividad y sobrevivencia de los linfocitos T de memoria ya que la inhibición de YME1L1 conduce a un aumento en la sobrevivencia de dichas células (Marceau et al., 2016).

SSR3: es una molécula asociada la translocación cotraduccional de las proteínas, mediada por secuencias señal, de tal manera que promueve la expresión adecuada de las glicoproteínas dirigidas al RE, por lo que se propone que su función puede estar relacionada con los factores destinados al RE durante la infección por DENV (He et al., 2021).

TIAL1: esta proteína colocaliza con los sitios de replicación del genoma de DENV, aunque falta información para dilucidar su función en la infección (Emara & Brinton, 2007); por otra parte, en otro flavivirus (virus del Nilo occidental) se ha visto que dicha proteína podría participar en los complejos que llevan a cabo la síntesis del RNA viral de polaridad positiva, por lo que podría realizar una función similar en DENV (Ward et al., 2011).

RACGAP1: esta proteína ha sido relacionada con la infección por el virus de la hepatitis C ya que promueve la replicación de este virus debido a su interacción con NS5B (RNA polimerasa viral), lo que aumenta su actividad (Su et al., 2016).

RFC1: esta proteína se ha encontrado como un factor sobre expresado 2.1 en la infección por DENV, sin embargo no se ha descrito ninguna función asociada a este virus (Shah et al., 2018).

ERGIC1: esta proteína se ha visto sobreexpresada 1.8 veces en condiciones de infección por DENV, no se tiene ninguna información en infecciones causadas por otros flavivirus (Shah et al., 2018).

En este trabajo se decidió abordar el papel de la proteína de membrana interna mitocondrial YME1L1 en la infección por DENV pues podría ayudar al entendimiento de su función en infecciones virales ya que esta proteína cumple importantes funciones mitocondriales y como se ha expuesto anteriormente, DENV puede afectar la dinámica y función mitocondrial lo que podría afectar la respuesta inmune, apoptosis, estrés oxidativo, autofagia, entre otros procesos.

La metodología utilizada para la búsqueda y análisis de la identificación de posibles blancos putativos modulados por los miRNA en la infección por DENV , se encuentra descrita en el anexo I.

YME1L1 es una metaloproteasa presente en la membrana interna mitocondrial perteneciente a la superfamilia AAA, estas proteínas presentan 4 motivos: de reconocimiento a ATP, de unión a Mg^{+2} , de unión a ATP y motivo HExxH. Estas proteínas son de dos tipos, las m-AAA que mantienen su dominio catalítico en la región de la matriz mitocondrial y las i-AAA que estas mantienen su dominio catalítico en el espacio intermembrana de la mitocondria. YME1L1 es una proteína tipo i-AAA que se encuentra en forma homohexamérica cuyo dominio catalítico se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria (Fig. 12)(Opalińska & Jańska, 2018).

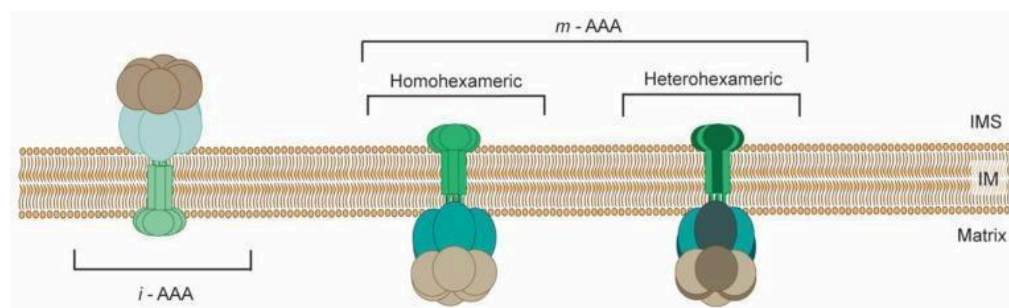


Fig. 12. Representación de las metaloproteasas AAA. En la imagen se pueden observar las metaloproteasas tipo i-AAA y las m-AAA, determinado por la dirección en el que se encuentra la región transmembranal. Imagen tomada y modificada de Opalińska & Jańska, 2018.

En levaduras, YME1 (homólogo de YME1L1) media el control de calidad mitocondrial eliminando proteínas mitocondriales mal plegadas, el papel de YME1 en la mitofagia es esencial al procesar Atg32 proteína mitocondrial en levadura la cual está asociada a YME1 para un buen funcionamiento en la mitofagia (Wang et al., 2013).

El proceso de mitofagia consiste de dos principales pasos: la fusión y la fisión; donde OPA1 (GTPasa) participa en la fusión de la membrana interna mitocondrial con la membrana externa mitocondrial, donde la pérdida de OPA1 induce fragmentación mitocondrial que culmina en la muerte celular, en caso contrario cuando existe una sobreexpresión de OPA1 esta causa alargamiento mitocondrial. OPA1 contiene dos sitios de corte (S1 y S2), mediados por dos diferentes metaloproteasas OMA1 y YME1L1 ambas pertenecientes a metaloproteasas del tipo i-AAA. OPA1 procesado presenta 5 tipos de fragmentos donde 2 son llamados OPA1L siendo los dos fragmentos más largos y 3 fragmentos cortos llamados OPA1S. Las proteasas que cortan este factor son OMA1 la cual se activará como una respuesta de estrés, mientras que YME1L1 se verá activada en respuesta a un aumento en la fosforilación oxidativa lo que propicia un aumento de las especies reactivas de oxígeno (Tilokani et al., 2018).

Un estudio demostró que YME1L es importante para el procesamiento de OPA1 a OPA1S, mientras que OMA1 es importante para el procesamiento de OPA1L, donde la pérdida de YME1L ha sido asociado a cambios morfológicos en la mitocondria, lo que causa que éstas sean mayormente susceptibles a apoptosis, debido a la acumulación de OPA1S, mientras que la ausencia de OMA1 no refleja cambios en la morfología de la mitocondria (Anand et al., 2014).

HIPÓTESIS

La proteína YME1L1 lleva a cabo funciones que modulan la infección por el virus del dengue.

JUSTIFICACIÓN

El Dengue es un problema de salud importante alrededor del mundo, afectando a las zonas tropicales y subtropicales, causando alrededor de 14.4 millones de infecciones y 11,126 muertes en 2024.

En la infección por dengue se han reportado cambios importantes en la dinámica, morfología y función mitocondrial que podrían estar relacionados con la gravedad de la enfermedad y los factores que participan en estos eventos podrían establecerse como blancos para terapias antivirales o como biomarcadores de gravedad.

La participación de la proteína YME1L1 en la supervivencia celular podría indicarnos que la regulación de su expresión durante la infección por dengue podría estar modulando el metabolismo, estrés oxidativo y la muerte celular, así como la respuesta inmune. En este proyecto proponemos iniciar con la investigación del papel que podría estar llevando a cabo la proteína YME1L1 en la infección por dengue y específicamente determinar el efecto del silenciamiento de dicha proteína en la replicación del virus, con lo cual se evidenciaría si se trata de un factor pro- o anti-viral, quedando como perspectivas el conocer cuáles son las determinantes importantes para dicha función de esta proteína.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto del silenciamiento de la proteína mitocondrial *YME1L1* en la infección por dengue.

Objetivos Específicos

- Determinar el nivel de expresión de *YME1L1* en células Huh-7 infectadas con respecto a las no infectadas.
- Establecer las condiciones para el silenciamiento de la expresión de *YME1L1* mediante shRNA.
- Conocer el efecto del silenciamiento de *YME1L1* en la producción del RNA del virus del dengue.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

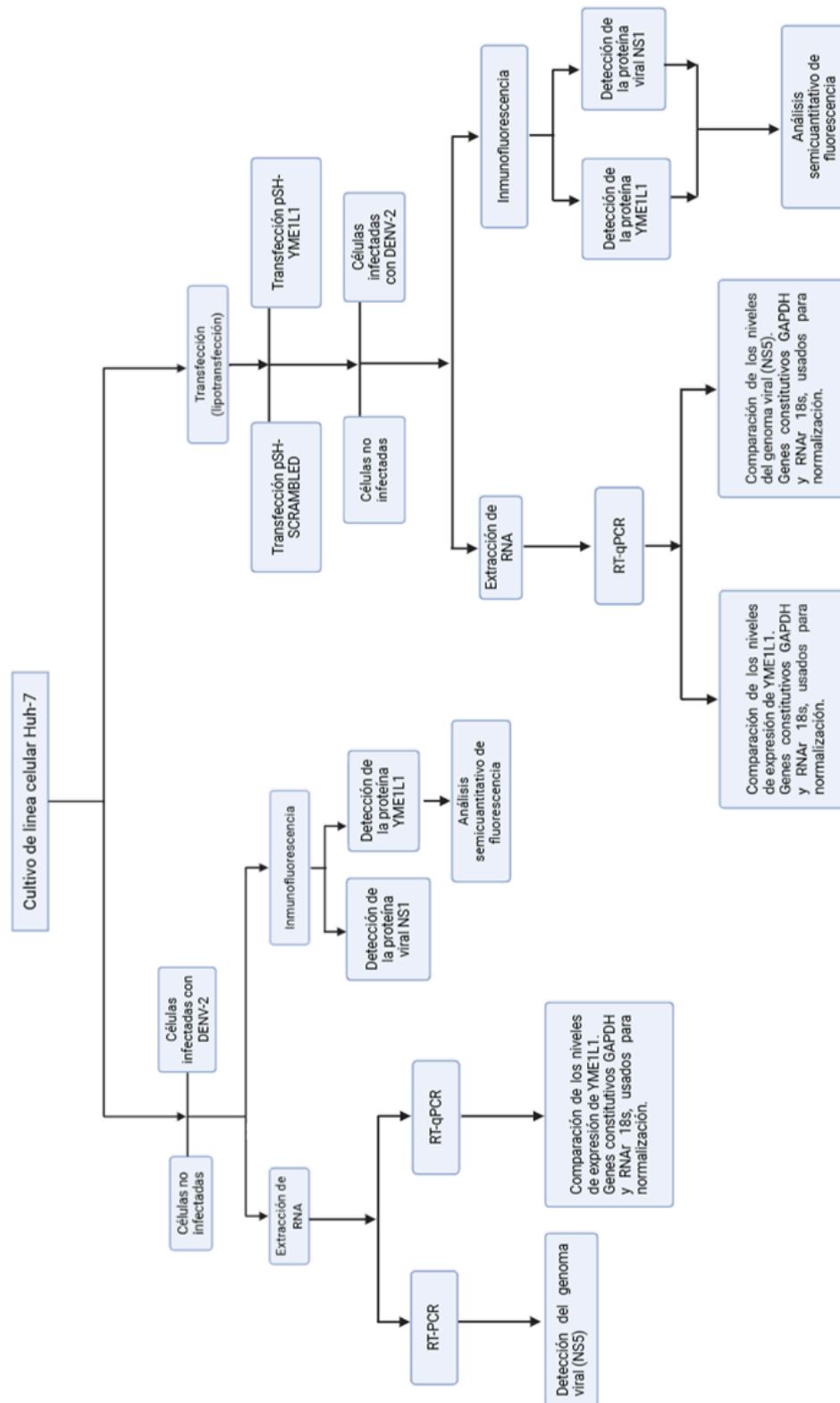


Fig. 13. Estrategia experimental.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

La línea celular de hepatocitos humanos Huh-7 se cultivó usando el medio Advanced DMEM (Gibco) con 5% de suero fetal bovino certificado [(SFB) Gibco], 4µM de Glutamina y 100 UI/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂.

Infección de las células Huh-7 con DENV

Para realizar la infección se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Las células Huh-7 se despegaron usando tripsina a una concentración de 1 mg/ml, se dejó actuar 240 segundos a 37°C, se retiró y se agregó medio de cultivo permitiendo que el pipeteo despegue las células. Las células se contaron en cámara de Neubauer para usar 80,000 células en cada pozo de una placa de 24 pozos en un volumen de 500 µl y se dejaron incubar por 24 h a 37 °C con 5% CO₂.
2. Después de este tiempo las células llegaron a una confluencia de aproximadamente el 70%, se retiró el medio y se lavaron con medio sólo, a continuación se agregó el virus a la MOI (multiplicidad de infección) de 0.1 o 1. El virus se diluyó en medio de cultivo sin suplementar en un volumen de infección de 250 µl y se incubó por 2 h con agitación cada 15 min.
3. Posteriormente se agregó medio con los suplementos mencionados arriba pero sólo con 2% de suero fetal bovino. La infección se dejó desarrollar por 24 y 48 h. En el caso de las condiciones no infectadas se realiza el mismo procedimiento sin embargo en lugar de agregar la dilución de virus sólo se agrega medio de cultivo.

Extractos de RNA total

Los extractos de RNA total se llevaron a cabo al terminar los tratamiento de infección y/o transfección para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

1. Las células se lavaron tres veces con 300 µl PBS estéril y después se retiró el último lavado y se agregó 190 µl de Trizol (Invitrogen) cuando se trató el área de la placas de 24 pozos, se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min y se transfirió el contenido del pozo a un microtubo de 1.5 ml estéril y se almacenó a -70°C hasta su uso.
2. Posteriormente se agregó 38 µl de cloroformo, se agitó e incubó a temperatura ambiente por 3 min. y centrifugar a 12000 x g por 15 min a 4°C para separar las fases acuosa y orgánica.
3. Enseguida, se tomó la fase acuosa, se depositó en un tubo nuevo y se añadió etanol grado biología molecular en una relación 1:1 del volumen recolectado, se mezcló y depositó en una columna (Zymo) y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min.
4. Se lavó la columna dos veces con 500 µl buffer de lavado (10mM Tris con 1mM EDTA y 60 % de etanol), centrifugar a 8000 rpm por 1 min después de cada lavado dar una centrifugación final a 13,000 rpm por 2 min.
5. La columna se pasó a un tubo nuevo para realizar la elución del RNA usando 30 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min. El RNA total de la muestra se cuantificó usando 1 µl de la solución en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

RT-qPCR para la detección del genoma viral

Los extractos de RNA total se trataron con DNAsa para evitar la amplificación a partir de DNA y no de los RNAm. Este tratamiento se realizó usando DNAsa RQ1 libre de RNAsa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocó 1µg de RNA, 1 µl de DNAsa y 1.5 µl de buffer de DNAsa 10X y agua libre de nucleasas para completar un volumen de 15 µl. Posteriormente se incubó a 37°C por 30 min. Enseguida se añadió 1.5 µl de solución de paro e incubar a 65°C por 10 min, se cuantificó 1 µl extracto tratado en nanodrop 2000 leyendo la absorbancia a 260nm y al terminar se almacenó a -70°C hasta su uso.

Los extractos de RNA total tratados con DNAsa se usaron para realizar ensayos de RT-qPCR para determinar la abundancia del genoma viral y del RNAm de YME1L1, usando como controles de expresión constitutiva los RNAm de GAPDH y RNAr 18S.

Las reacciones para la cuantificación relativa del genoma viral se realizaron con el kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystems), de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. La mezcla de reacción se realizó con 2 µl de buffer de RT-PCR, 1.25 µl del iniciador sentido a 2 µM y 1.25 µl del iniciador antisentido a 2 µM, 500 ng del RNA total y agua libre de nucleasas para completar 10 µl.

Los iniciadores para la amplificación del genoma de DENV se dirigen a una región de NS5 (RNA polimerasa viral) con un amplicón esperado de 260 pb y sus secuencias son las siguientes: iniciador sentido 5'-TAC AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG AA-3'; iniciador antisentido: 5'-GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA G-3'.

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 10 min a 45°C, 1 ciclo de 15 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 57°C y 30 s 60°.

Asimismo se llevó a cabo la amplificación de los controles de normalización usando las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior con los siguientes iniciadores: GAPDH sentido 5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC-3'; GAPDH antisentido 5'-CCA ATA CGA CCA AAT CCG TTG-3'; RNAr 18S sentido 5'-GGG AGG TAG TGA CGA AAA ATA ACA AT-3'; RNAr 18S antisentido Primer Rv 18s 5'- TTG CCC TCC AAT GGA TCC T-3' (Zhu & Altmann, 2005). Los amplicones esperados son de 100 pb para GAPDH y 101 pb para RNAr 18S.

En el caso de la cuantificación relativa del RNAm YME1L1 se utilizó el kit High Capacity Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó una mezcla de reacción de la siguiente manera: 2 µl de buffer 10x, 0.8 µl de dNTPs mix, 2 µl de iniciadores al azar, 1 µl Inhibidores de RNAsas, 1 µl de la enzima RT multiscibe, 500 ng de RNA y agua libre de nucleasa suficiente para un volumen final de 20 µl.

Las condiciones del termociclador para esta reacción de retrotranscripción son: 1 ciclo de 10 min a 25°C, 1 ciclo de 120 min a 37°C, 1 ciclo de 5 min a 85°C y 4°C. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso o se pueden utilizar inmediatamente para preparar las reacciones de qPCR.

Las reacciones de PCR se realizaron usando el kit Quantitect SYBR green PCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción se preparó usando 5 µl del master mix 2x, 1.25 µl del primer sentido a 2 µM, 1.25 µl del primer antisentido a 2 µM, 1 µl de la reacción de RT y agua de ampollita para completar 10 µl. Los iniciadores para YME1L1 produce un amplicón de 190 pb y la secuencia del iniciador sentido es 5'-GCC CCT GTT TCT GTC CTG TA-3' y del antisentido es 5'-TCG CTC AGT CTC TGC TTT CA-3'.

Es importante mencionar que los controles de normalización que se usaron en las reacciones de RT-qPCR en dos etapas son GAPDH Y RNAr 18S bajo las mismas condiciones descritas en párrafos anteriores para la RT-qPCR en una etapa.

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 2 min a 50°C, 1 ciclo de 15 min a 95°C, 40 ciclos de las siguientes tres condiciones de 15 s a 94°C, 30 s a 57°C y 30 s a 72°C y finalmente 1 ciclo de 4°C hasta parar el equipo.

Cabe mencionar que todas las reacciones de tiempo real se realizaron en el equipo Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System.

Inmunofluorescencia para la detección de YME1L1 y la proteína viral NS1 en células Huh-7

Las células Huh-7 se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 24 pozos para alcanzar una confluencia de 70-80% al siguiente día y así llevar a cabo los procedimientos de transfección y/o infección con DENV. Después de concluir el tratamiento se retiró el medio de cultivo del pozo y se realizaron 3 lavados con PBS estéril filtrado. Enseguida se fijaron las células con paraformaldehído al 2% por 30 min a temperatura ambiente para después lavar 3 veces con PBS y preceder a

permeabilizar con acetona fría (-20°C) por 2 min y lavar de nuevo tres veces con PBS.

Posteriormente se bloqueó con PBS-SFB 10% por 2 h a temperatura ambiente luego lavar tres veces con PBS y se agregaron 30 µl del anticuerpo primario, anti-YME1L1 de conejo [(1:50 en PBS-SFB 1%)(Novus Biologicals Cat. NBP2-49499)] o anti NS1 de ratón [(1:100 PBS-SFB 1%)(Abcam Cat. ab41616)] para dejar una incubación inicial de 1 h a temperatura ambiente y después toda la noche a 4°C. Luego se lavaron 3 veces con PBS y se incubó por 1 h en oscuridad con 50 µl de un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488 para YME1L1 (Jackson Immunoresearch Cat. 111-545-144) o anti-ratón para NS1 (Jackson Immunoresearch Cat. 115-545-146)], ambos diluidos 1:300 en PBS-SFB 1%. Se lavó 3 veces con PBS y se tiñeron los núcleos con DAPI [(5mg/ml) Invitrogen] diluido 1:10,000 en agua, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS y una vez con agua. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos estériles con 5 µl Vectashield (VectorLabs), se sellaron y se analizaron en el microscopio confocal.

Cabe mencionar que todos los lavados se hacen con 2 ml de PBS en agitación lenta por 3 min y la incubación de los anticuerpos se realiza en cámara húmeda. Es importante recalcar que después de agregar el anticuerpo secundario, todas las incubaciones deben llevarse a cabo cubiertas de la luz.

Clonación de sh-YME1L1 y sh-Scrambled en pSilencer 5.1 U-6 Retro.

La clonación del short hairpin dirigido contra YME1L1 se realizó atendiendo las instrucciones del fabricante de pSilencer 5.1 U-6 Retro [Fig. 14 (Thermo Fisher)] en el que se insertará el fragmento de interés. Primeramente se diseñaron los oligonucleótidos cuya secuencia es la siguiente: YME1L1 sentido 5'-GAT CCA GTT CCA AGG CCA GAT GTA TCA AGA GTA CAT CTG GCC TTG GAA CTT TTT GGA AA-3'; YME1L1 antisentido 5'-AGC TTT TCC AAA AAA GTT CCA AGG CCA GAT GTA CTC TTG ATA CAT CTG GC CTT GGA ACT G-3'; Scrambled sentido 5'-GAT CCA CTG AAC AGC GAC GTG ATT TCA AGA GAA TCA CGT CGC TGT TCA GTT TTT TGG AAA-3'. Scrambled antisentido 5'-AGC TTT TCC AAA AAA CTG AAC AGC

GAC GTG ATT CTC TTG AAA TCA CGT CGC TGT TCA GTG-3'. La secuencia de referencia para YME1L1 tiene el número de acceso NM_014263.4, consiste en 4191 nt y la secuencia seleccionada para el shRNA va del nt 1512 al 1530. En el caso de la secuencia scrambled, se verificó en BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no hubiera blancos predichos en humanos para el sh-Scrambled diseñado.

Los iniciadores se hibridaron mezclando 2 µl de cada iniciador a 1 µg/µl y 46 µl de buffer de alineamiento de DNA para completar 50 µl, luego se incubaron por 3 min a 90°C y 1 h a 37°C y después se procedió a la digestión de los fragmentos hibridados o se guardaron a -20°C hasta su uso. La hibridación se verificó en gel de agarosa al 3%.

Los oligonucleótidos hibridados y el plásmido vector pSilencer 5.1 U-6 Retro se sometieron a restricción con las enzimas BamHI (NEB Cat R0136S) y HindIII (NEB Cat R0104S), las mezclas de reacción para este propósito se componen de 2 µg de plásmido o de los oligonucleótidos hibridados, 2 µl de buffer smart cutter 10x, 2 µl de BamHI, 2 µl de HindIII y agua de ampolleta para completar 20 µl. Después de incubarse a 37°C por 4 h, se verificó el corte en gel de agarosa al 0.8%, luego se cortaron las bandas de los fragmentos de interés y purificaron usando el kit Qiaquick gel extraction (Qiagen).

Las bandas del vector y los insertos purificados se ligaron usando la ligasa T4 (Promega Cat M180A) en una proporción 1:3 plásmido/inserto. La mezcla de reacción consistió en 1 µl de T4 ligasa, 1 µl de buffer de ligación 10x, la cantidad necesaria de vector e inserto para la proporción mencionada y agua de ampolleta para completar 10 µl. Enseguida se realizó una incubación a 4°C toda la noche o 4 h a 15°C.

Posteriormente se llevó a cabo la transformación bacteriana usando 50 µl de *E.coli* DH5α con el plásmido obtenido de la ligación tanto los controles sin inserto como los que contienen el fragmento sh-YME1L1, sh-Scrambled y el control sin plásmido. Se incubó la mezcla 30 min en hielo y luego se dio un choque térmico a 42 °C por 90 s, se regresaron al hielo y se agregaron 250 µl de medio LB sin antibiótico, se incubó a

37°C por 2 h a 180 rpm para finalmente sembrar en cajas Petri con LB agar con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron 10-20 colonias y se sembraron en 5 ml de LB líquido con 100 µg/ml de ampicilina e incubaron a 37°C a 180 rpm. Las clonas seleccionadas se dejaron creciendo toda la noche, se cosecharon y empastillaron para purificar el plásmido mediante el protocolo de lisis alcalina.

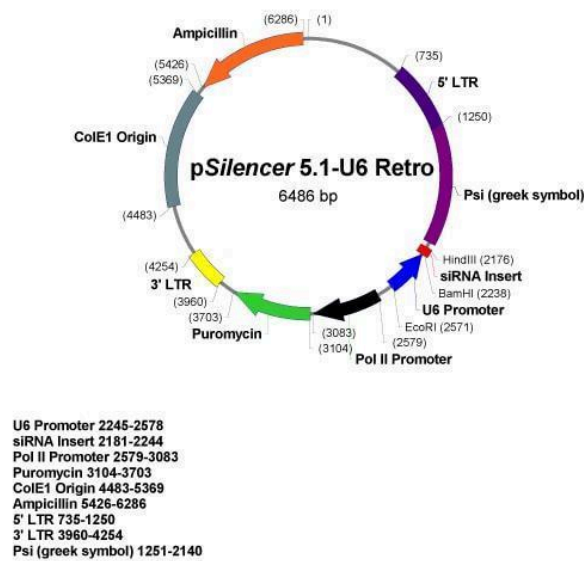


Fig. 14. Mapa del vector pSilencer 5.1- U6 Retro. En la imagen se esquematiza el vector utilizado para el silenciamiento de YME1L1 mediante shRNA.

PCR de colonia

Con la finalidad de evaluar si las colonias que crecieron en las placas después de la transformación contenían el inserto de interés se realizó la técnica de PCR de colonia en la cual se utilizaron iniciadores que se unen al plásmido vector y permitieron distinguir por el tamaño del amplicón si contienen un inserto de 60 nt. En este contexto se diseñaron dos pares de primers unos que se aplicarán para la amplificación del plásmido con sh-YME1L1 como inserto cuya secuencia es: pSH-YME1L1 sentido 5'-CTG CAG CAT CGT TCT GTG TT-3', pSH-YME1L1 antisentido 5'-CAG ATG TAT CAA GAG TAC ATC-3', amplicón 563 pb; pSH-SCRAMBLED sentido 5'-GTC CCC TAC ATC GTG ACC T-3',

pSH-SCRAMBLED antisentido 5'-ACG TGA TTT CAA GAG AAT C-3', amplicón 298 pb.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el kit Hot Start Taq Plus Master Mix (Qiagen, Cat 203643), la mezcla de reacción consistió en 5 µl de 2x HotStarTaq Plus Master Mix 2x, 1.25 µl de iniciador sentido 2 µM, 1.25 µl de iniciador antisentido 2 µM, agua de ampolla para completar 10 µl y una asada de la colonia seleccionada. Las condiciones de amplificación son las siguientes: 1 ciclo de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 45 s a 72°C y un ciclo final de 10 min a 72°C. Separar los productos de PCR en gel de agarosa al 2%.

Transfección del plásmido pSH-YME1L1 y pSH-SCRAMBLED en células Huh-7.

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos a 80,000 células por pozo y 24 h después se transfectaron con Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo del fabricante. Primeramente se mezclaron 0.8 µg de pSH-YME1L1 o pSH-SCRAMBLED, 1.6 µl de P3000 y el volumen necesario de medio Optimem (Invitrogen) para un volumen final de 50 µl. Enseguida se preparó una segunda mezcla con 1.5 µl de Lipofectamina 3000 por pozo y 48.5 µl de medio Optimem para un volumen final de 50 µl, se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente. Luego se mezclaron de manera suave la mezcla 1 y la mezcla 2, obteniendo un volumen de 100 µl y se dejó incubar 15 min adicionales a temperatura ambiente. Después se lavaron los pozos con 300 µl de medio Optimem I y se dejaron con 250 µl del mismo medio y finalizado el tiempo de incubación se agregó el volumen completo de la mezcla para tener un volumen final de 350 µl. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ a los diferentes tiempos post transfección o se infectaron con DENV-2 después de 24 h.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por la prueba de ANOVA y la post-prueba de Tukey para múltiples comparaciones. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Los análisis de datos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.2.

RESULTADOS

Determinación de la expresión del gen *YME1L1* en células Huh-7 infectadas con DENV-2.

Para determinar la expresión de *YME1L1* en la infección por DENV se infectaron células Huh-7 con DENV-2 a una MOI de 0.1 y se realizó un extracto de RNA total a las 24 y 48 h post infección. Este ensayo permitió corroborar los resultados previamente publicados acerca de la expresión de *YME1L1* en células infectadas con DENV (Shah et. al. 2018). Primeramente, con la finalidad de corroborar la infección se realizó una RT-PCR para la detección del genoma viral mediante el uso de los oligonucleótidos específicos contra la proteína no estructural NS5 (Fig. 15).

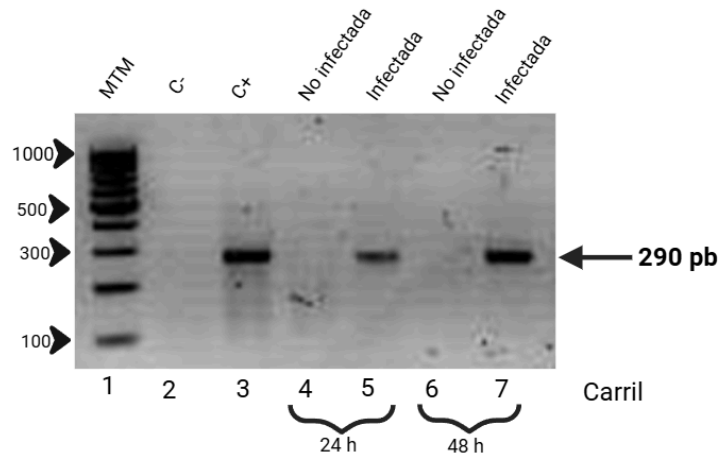


Fig. 15. Amplificación de una región del genoma viral que codifica para la proteína NS5 de DENV a partir de células infectadas. Los extractos de RNA total de células Huh-7 no infectadas (carriles 4 y 6) e infectadas (carriles 5 y 7) a una MOI de 0.1. Los extractos de RNA se obtuvieron a las 24 h (carriles 4 y 5) y 48 h (carriles 6 y 7) post infección. Los controles de amplificación negativo (C-, carril 2) y positivo (C+, carril 3) se incluyeron en el experimento. Imagen representativa de tres experimentos independientes, los marcadores de tamaño molecular (MTM) de 100 pb de (Thermo Fisher) se cargaron en el carril 1.

Posteriormente se estandarizaron las condiciones para la amplificación del RNAm de *YME1L1*, para lo cual se diseñaron un par de oligonucleótidos que se utilizaron para llevar a cabo una reacción de RT-PCR usando extractos de RNA total de células Huh-7 a temperaturas de alineamiento de 55, 57 y 59°C y, aunque en todas las condiciones se observó el amplicón esperado, en 55 °C se observó una banda muy tenue, mientras que a 57°C y 59°C se observó un amplicón más denso. Por lo

anterior, se decidió elegir la temperatura de 57°C para llevar a cabo los experimentos siguientes pues coincide con la temperatura de alineamiento de los iniciadores para la amplificación de los genes que se utilizan en la normalización de datos. En la Fig. 16, se observa el resultado de dicha reacción, en donde se obtuvo un único amplicón de 190 pb. Posteriormente se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la RT-qPCR para la cuantificación relativa de la expresión de *YME1L1* usando como controles de normalización a GAPDH y RNAr 18s cuyos amplicones son de 100 y 101 pb, respectivamente.

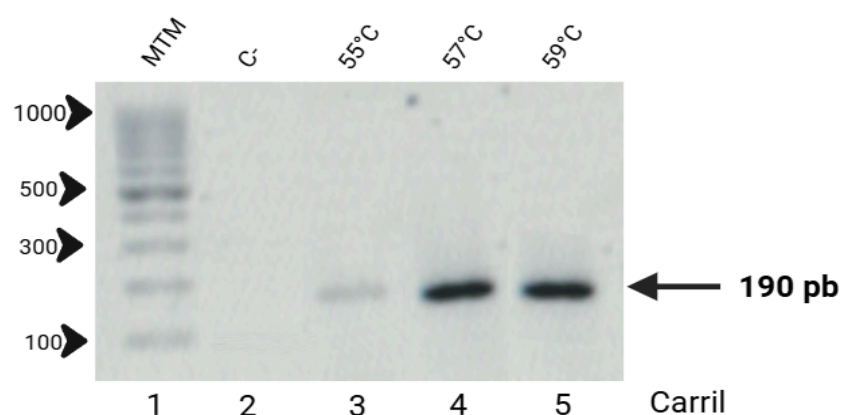


Fig. 16. Amplificación del RNAm de *YME1L1* por RT-PCR. Los extractos de RNA total de células Huh-7 se utilizaron para llevar a cabo la reacción de RT-PCR usando primers que flanquean la región de *YME1L1*, esperando un amplicón de 190 pb. En la parte superior se muestran las temperaturas de amplificación (carril 3, 4 y 5). El control negativo (C-, carril 2) se incluyó en el experimento, los marcadores de tamaño molecular (MTM) de 100 pb (Thermo Fisher) se cargaron en el carril 1.

Los resultados de los ensayos de RT-qPCR indicaron que durante la infección existe un aumento en la expresión de *YME1L1* a las 24 y 48 h post-infección con un aumento de alrededor de 1.5 veces con respecto a la expresión de dicho mensajero en células no infectadas a los mismos tiempos (Fig 17).

Lo anterior nos permitió concluir que las células infectadas por dengue presentaron un aumento en la expresión de *YME1L1* en concordancia con lo reportado por Shan P. y cols (2018), quienes determinaron que la infección por dengue indujo un aumento de 1.6 veces en la expresión de esta proteína en células Huh-7.

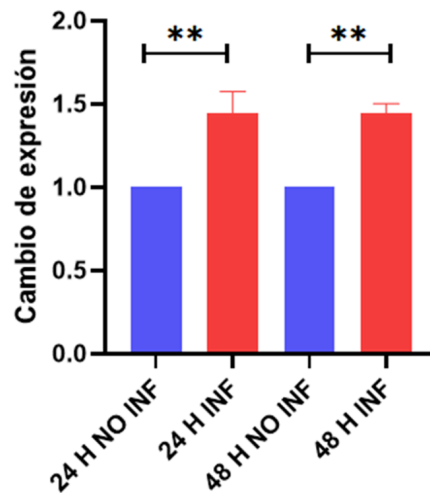


Fig. 17. Expresión relativa de *YME1L1* en células Huh-7 no infectadas e infectadas. Los extractos de RNA total de células no infectadas e infectadas con DENV-2 a una MOI de 0.1 a las 24 o 48 h post infección se utilizaron para la amplificación de *YME1L1* utilizando a los RNAm de GAPDH y RNAr 18S como genes de expresión constitutiva para la normalización de los datos. Los resultados corresponden a al menos tres experimentos independientes con sus respectivas réplicas técnicas. Las barras representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes cuyos valores se calcularon utilizando la prueba de ANOVA. Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.01$ (**).

Adicionalmente se implementó la infección a una MOI de 1 para verificar que en ambas condiciones de infección se observaban los mismos efectos sobre *YME1L1*. Como se puede observar en la figura 18 los resultados de tres experimentos independientes nos mostraron que a las 24 h post infección se promovía un aumento en la expresión de *YME1L1* de alrededor de 1.5 veces con respecto a las células no infectadas; sin embargo a las 48 h post infección el aumento fue no significativo (ns) y menor que lo encontrado en la infección a MOI de 0.1.

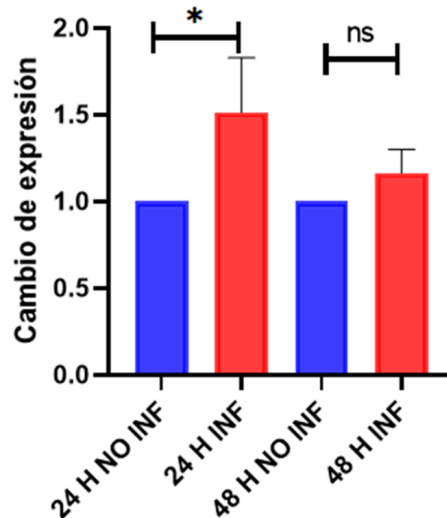


Fig. 18. Expresión relativa de *YME1L1* en células Huh-7 no infectadas e infectadas. Los extractos de RNA total de células no infectadas e infectadas con DENV-2 a una MOI de 1 a las 24 o 48 h post infección se utilizaron para la amplificación de *YME1L1* utilizando a los RNAm de GAPDH y RNAr 18S como genes de expresión constitutiva para la normalización de los datos. Los resultados corresponden a al menos tres experimentos independientes con sus respectivas réplicas técnicas. Las barras representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes cuyos valores se calcularon utilizando la prueba de ANOVA. Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.05$ (*), ns: no significativo.

Por otro lado, para corroborar los resultados de la expresión de *YME1L1* obtenidos por RT-qPCR se realizaron ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para la detección de esta proteína mediante microscopía confocal. Primeramente, se hicieron los experimentos para verificar que las células se encontraban infectadas con DENV, para lo cual se usó un anticuerpo monoclonal anti-NS1, una proteína viral no estructural. Como se puede observar en la figura 19 las células infectadas a una MOI de 0.1 fueron positivas a NS1 (fluorescencia verde) cuya señal fue mayor a las 48 h post infección como era lo esperado. Cabe mencionar que las células no infectadas carecían de señal para NS1 pero presentaban la señal correspondiente a la tinción nuclear en la que se usó DAPI (azul). En la figura 20 podemos observar los resultados de la tinción de la proteína NS1 en células infectadas a una MOI de 1, y tal como se esperaba, la señal de NS1 fue más abundante que la detectada a una MOI 0.1 y mayor a 48 h post infección.

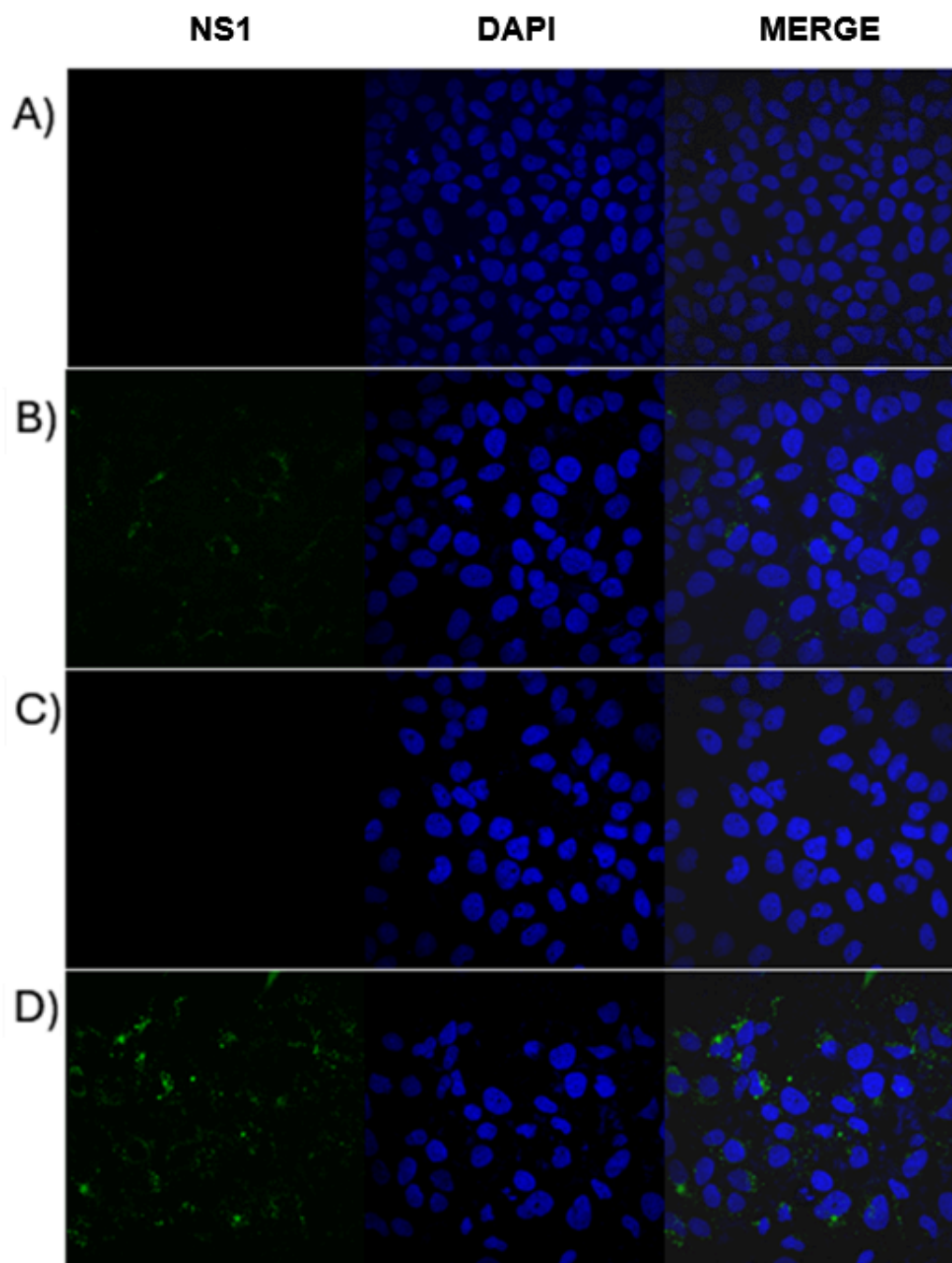


Fig. 19. Detección de la proteína NS1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 0.1. Imágenes representativas de células Huh-7 no infectadas (A) e infectadas (B) con DENV-2 a las 24 h post infección; o no infectadas (C) e infectadas (D) con DENV-2 a las 48 h post infección. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y NS1 se detectó mediante un anticuerpo Anti-NS1 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde); Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV4000 con el objetivo 60X.

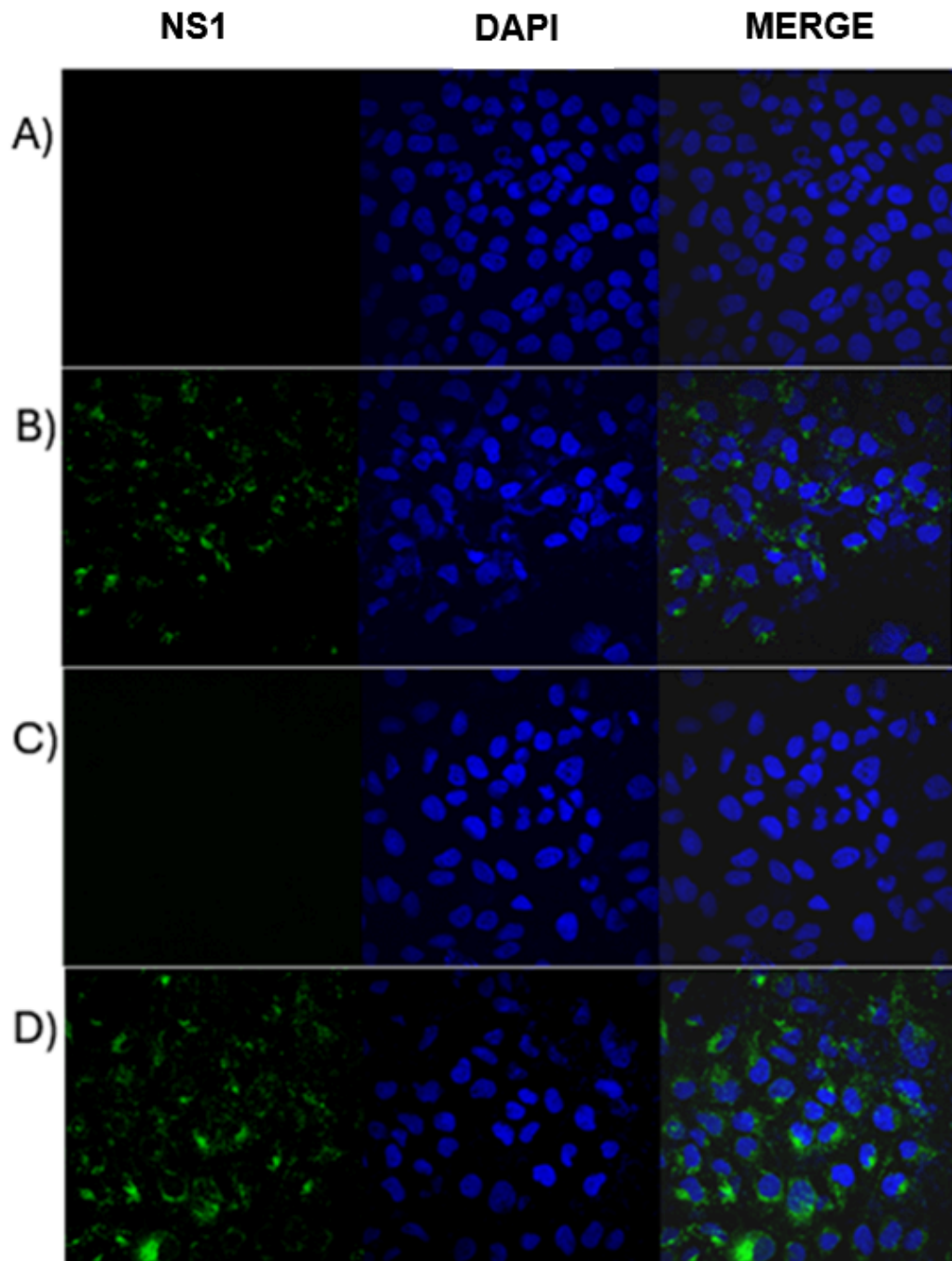


Fig. 20. Detección de la proteína NS1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 1 . Imágenes representativas de células Huh-7 no infectadas (A) e infectadas (B) con DENV-2 a las 24 h post-infección así como no infectadas (C); o infectadas (D) a las 48 h post infección. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y NS1 se detectó mediante un anticuerpo Anti-NS1 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde); Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV4000 con el objetivo 60X.

Con respecto a la detección de YME1L1, los resultados se muestran en la figura 21, donde se pudo apreciar que las células infectadas a una MOI de 0.1 presentaron un aumento en la señal de YME1L1 correspondiente a la tinción con Alexa 488, tanto a las 24 como las 48 h post infección, cuando se compararon con las células no infectadas a los mismos tiempos. Como se puede observar en dicha figura, la señal de la proteína se observó principalmente en el área citoplásmica.

Enseguida se procedió a determinar de manera semicuantitativa el cambio de expresión de la proteína de interés en condiciones de infección. La cuantificación de la señal fluorescente se realizó utilizando el programa Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) version 1.54p, en el que se cuantificaron los píxeles del fluoróforo de interés en los campos capturados. Como se pudo observar en la figura 21, las células infectadas a MOI de 0.1 presentaron un aumento significativo en la señal correspondiente a YME1L1 a las 24 h de 1.45 veces lo encontrado a ese tiempo en células no infectadas. En el caso de las células infectadas por 48 h se observó también un aumento en la señal de YME1L1 sin embargo el cambio no resultó estadísticamente significativo. En el caso de las células infectadas a una MOI de 1 se observó un aumento significativo de en la señal de fluorescencia de YME1L1 a las 24 h post infección, este resultó de 2.6 veces con respecto a las células no infectadas, sin embargo al igual que los resultados de RT-qPCR a esta MOI, hubo una tendencia a una mayor expresión de esta proteína a las 48 h post infección pero el cambio no resultó ser estadísticamente significativo (Fig. 22). Los experimentos de infección se realizaron en adelante solamente a una MOI de 0.1 debido a que los resultados son muy parecidos en ambas MOIs.

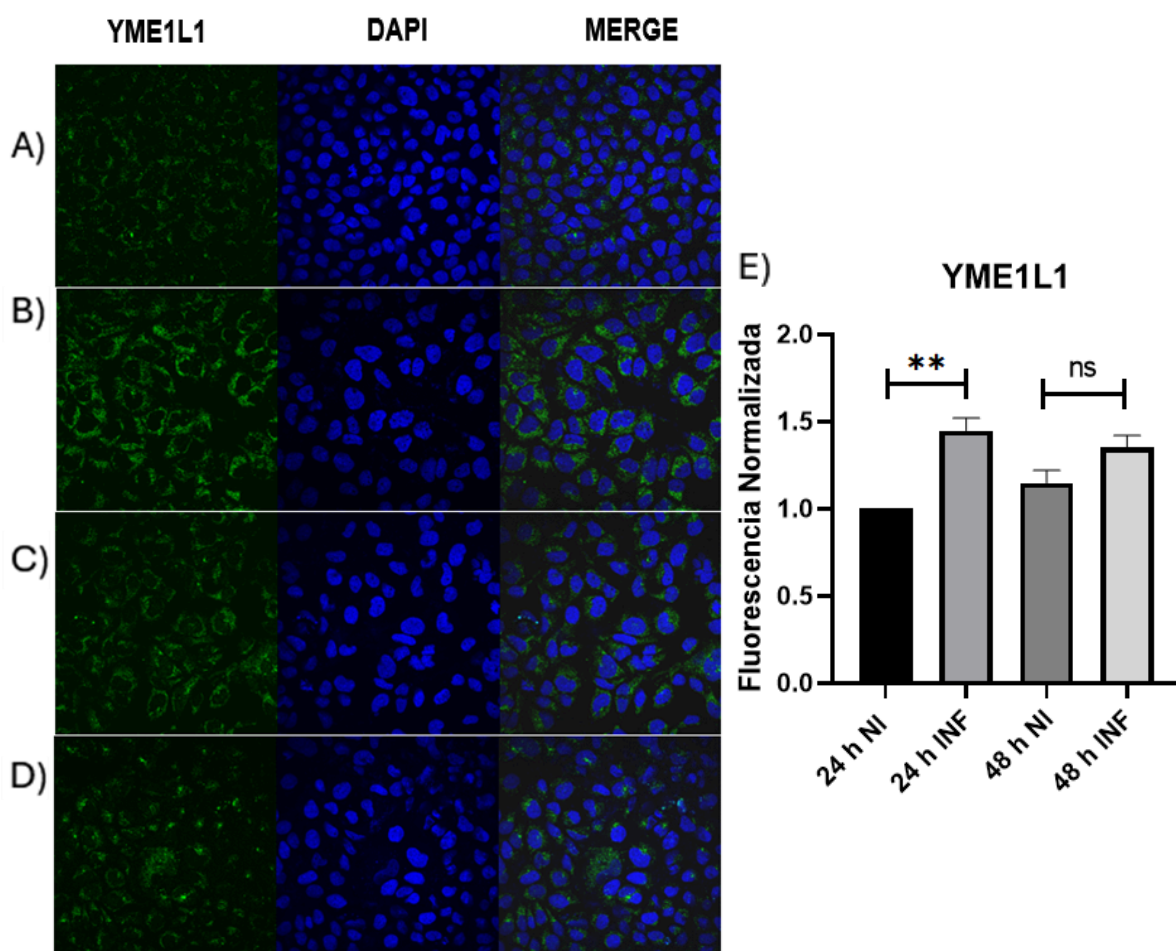


Fig. 21. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 0.1. Imágenes representativas de células Huh-7 no infectadas (A) e infectadas (B) con DENV-2 a las 24 h post-infección así como no infectadas (C) o infectadas (D) a las 48 h post-infección. E) Gráfica de fluorescencia normalizada para las condiciones antes mencionadas, los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes para lo cual se utilizó el programa Fiji image versión 2.14 y una prueba de ANOVA (GraphPad Prism versión 8.0.2). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y YME1L1 se detectó mediante un anticuerpo Anti-YME1L1 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde); Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV4000 con el objetivo 60X.

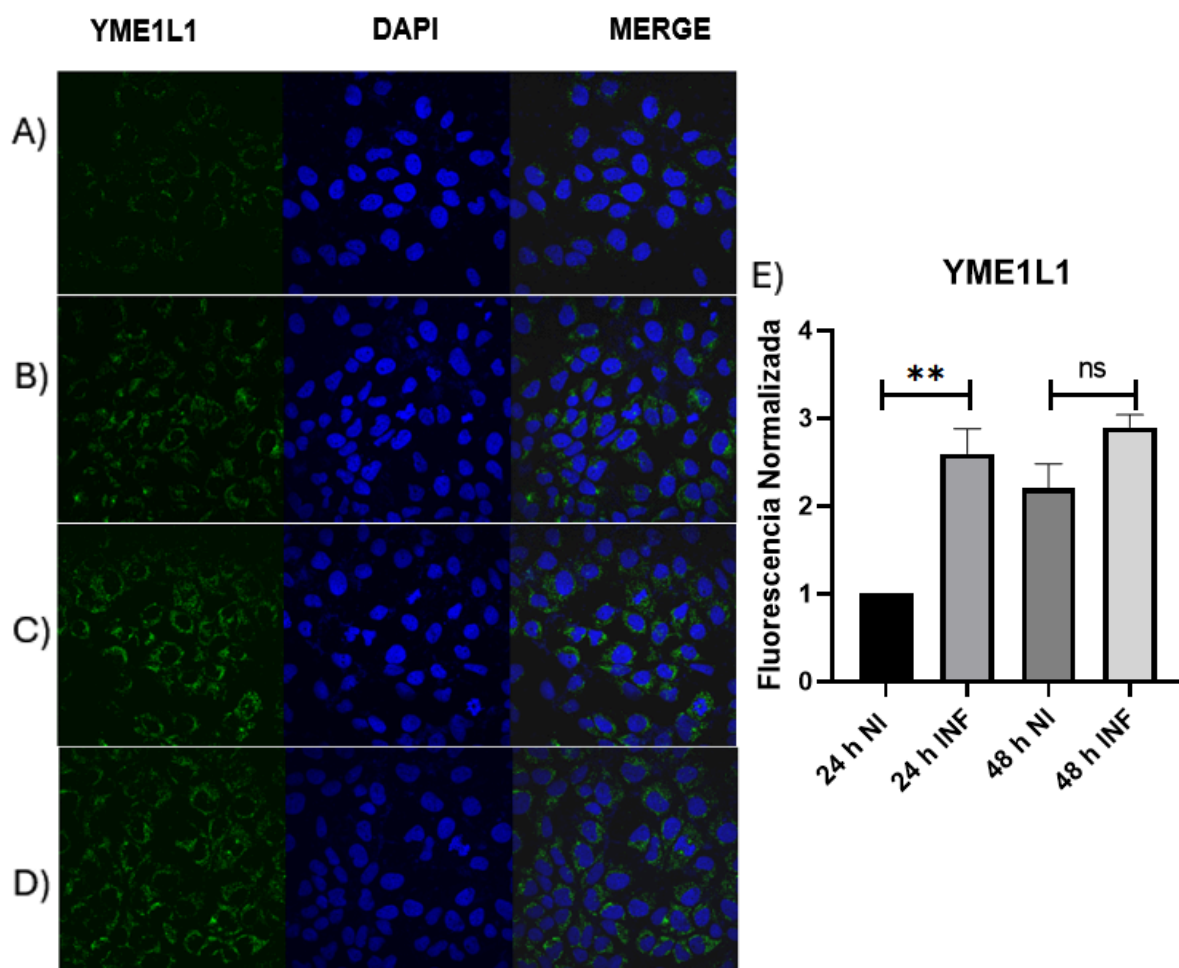


Fig. 22. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 infectadas con DENV-2 a una MOI de 1. Imágenes representativas de células Huh-7 no infectadas (A) e infectadas (B) con DENV-2 a las 24 h post-infección así como no infectadas (C) o infectadas (D) a las 48 h post-infección. E) Gráfica de fluorescencia normalizada para las condiciones antes mencionadas, los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes para lo cual se utilizó el programa Fiji image versión 2.14 y una prueba de ANOVA (GraphPad Prism versión 8.0.2). Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.01$ (**). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y YME1L1 se detectó mediante un anticuerpo Anti-YME1L1 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde); Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV4000 con el objetivo 60X.

Lo anterior nos permitió confirmar que la infección viral indujo un aumento en la expresión de la proteína YME1L1 a las 24 y 48 h post infección y que este aumento se podría relacionar con funciones pro virales o antivirales de esta proteína que

podrían afectar de manera directa o indirecta el ciclo replicativo de DENV en esta línea celular.

Construcción del plásmido pSH-YME1L1 para el silenciamiento de la proteína YME1L1

Para determinar el papel de YME1L1 durante la infección por DENV, se silenció a *YME1L1* mediante shRNA usando el vector psilencer 5.1 U-6 RETRO.

El RNAm de *YME1L1* humano consiste de 4191 nt (NM_014263.4) y se utilizó para seleccionar la región blanco de los short hairpin RNAs (shRNAs) y así producir el silenciamiento en la expresión de dicha proteína. La región seleccionada en dicho mensajero va del nt 1512-1530 y esta fué la base del diseño de los oligonucleótidos sentido y antisentido que contienen la región seleccionada así como los sitios de restricción BamHI y HindIII que se utilizaron para la inserción de dicho fragmento en el vector. Posteriormente, se hibridaron los oligonucleótidos y tanto dicha secuencia como el plásmido vector se sometieron a restricción con las enzimas mencionadas para posteriormente ligar ambos elementos. Es importante mencionar que se llevó a cabo el mismo procedimiento con una secuencia de los oligonucleótidos que contenía los mismos nucleótidos pero de manera desordenada a la que llamamos secuencia “scrambled”.

Las dos secuencias fueron usadas para transformar *E. coli* DH5 α para posteriormente confirmar que los plásmidos resultantes contenían el inserto de interés en el sentido mediante ensayos de PCR de colonia y secuenciación de Sanger. Como se puede observar en la figura 23, la mayoría de las colonias seleccionadas dieron un amplicón del tamaño esperado cuando se realizó una PCR de colonia usando primers que debieran producir un amplicón de 563 pb, en el caso de tener el inserto. Después de obtener resultados positivos en la PCR de colonia, se purificó el plásmido de la clona 8, al que llamamos pSH-YME1L1, y se envió a secuenciación de Sanger a la empresa MacroGen.

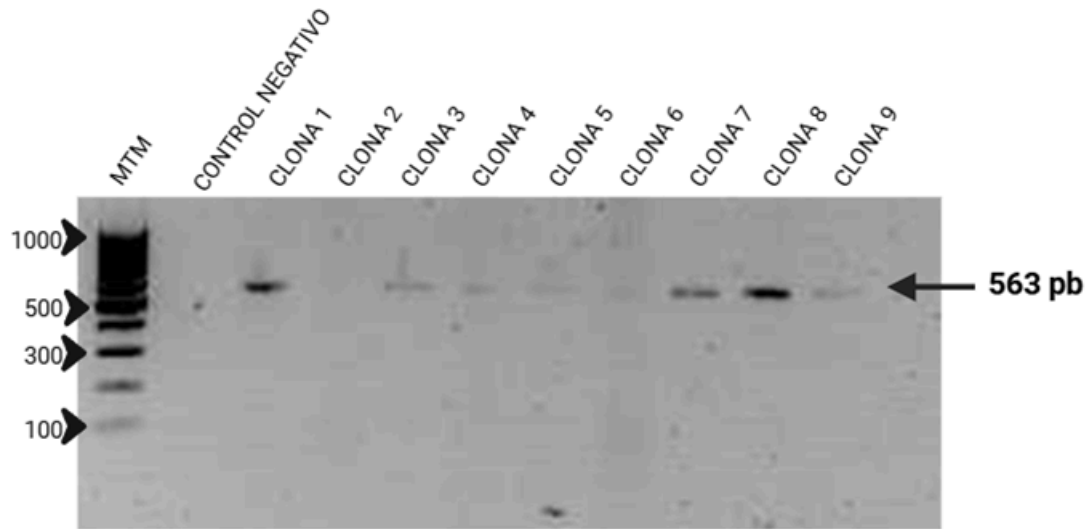


Fig. 23. Verificación mediante PCR de pSH-YME1L1. Las colonias seleccionadas se cultivaron en medio líquido y se purificó el DNA plasmídico el cual se utilizó para la reacción de PCR usando primers que flanquean la región del inserto que en caso de ser positivas producen un amplicón de 563 pb. Los marcadores de tamaño molecular (MTM) utilizados son de 100 pb (Thermo Fisher).

En el caso de la clonación de la secuencia “scrambled” se llevó a cabo el mismo procedimiento y como se pudo observar en la figura 24, la PCR de colonia usando otro juego oligos que debía dar como resultado un amplicón de 298 pb sólo en tres de las clonas (clona 4, clona 6 y clona 8) seleccionadas se obtuvo dicho amplicón. El plásmido llamado pSH-SCRAMBLED fué purificado de la clona 4 y enviado a secuenciación de Sanger.

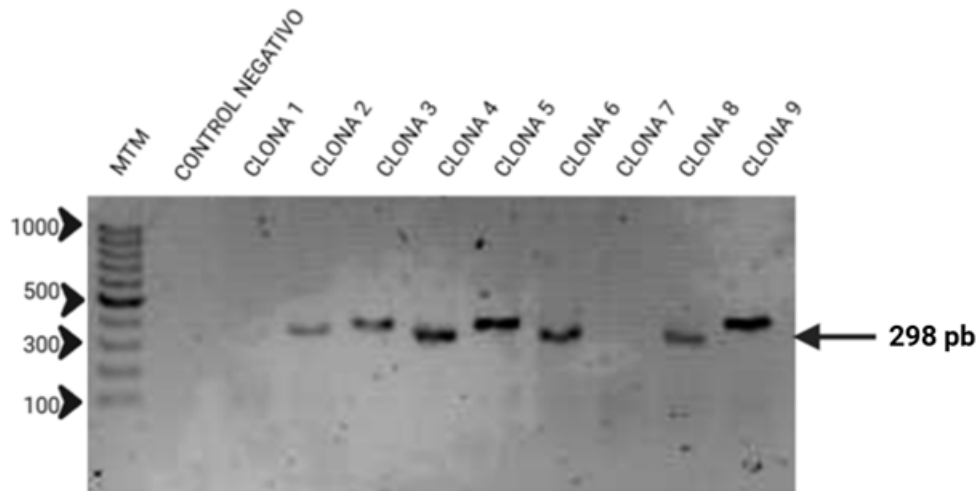


Fig. 24. Verificación mediante PCR de pSH-SCRAMBLED. Las colonias seleccionadas se cultivaron en medio líquido y se purificó el DNA plasmídico el cual se utilizó para la reacción de PCR usando primers que flanquean la región del inserto que en caso de ser positivas producen un amplicón de 298 pb. Los marcadores de tamaño molecular (MTM) utilizados son de 100 pb (Thermo Fisher).

Los resultados de la secuenciación se analizaron con el programa MAFFT y se visualizaron en <https://www.jalview.org/> versión 2.11.4.1. Como se pudo observar en la figura 25, el alineamiento de la secuencia esperada con respecto a la obtenida resultó en la identificación de los 60 nt correspondientes al shRNA para YME1L1.

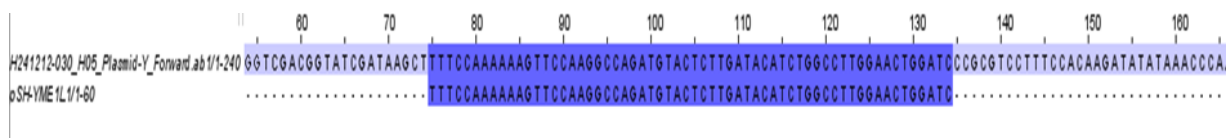


Fig. 25. Alineamiento de la secuencia obtenida y la secuencia esperada para pSH-YME1L1. En la imagen se aprecia en la parte superior, la secuencia obtenida a partir del plásmido obtenido experimentalmente y secuenciado por el método de Sanger y en la parte inferior la secuencia esperada.

En el caso de la secuencia obtenida para pSH-SCRAMBLED, se alineó en MAFFT y se visualizó en <https://www.jalview.org/> versión 2.11.4. Como se pudo observar en la figura 26, el resultado del alineamiento de la secuencia del plásmido obtenido con la secuencia esperada da una coincidencia del 100% con respecto al inserto correspondiente a las 60 pb.

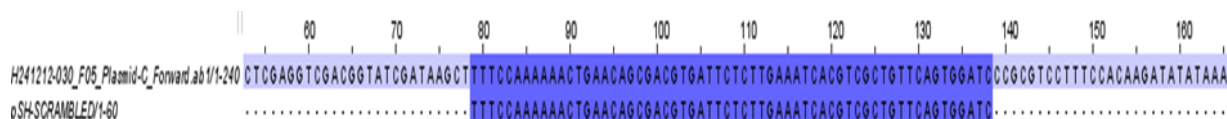


Fig. 26. Alineamiento de la secuencia obtenida y la secuencia esperada para pSH-SCRAMBLED. En la imagen se aprecia en la parte superior, la secuencia obtenida a partir del plásmido obtenido experimentalmente y secuenciado por el método de Sanger y en la parte inferior la secuencia esperada.

Después de obtener los plásmidos y corroborar que las secuencias corresponden con los insertos de interés se procedió a estandarizar los ensayos de silenciamiento.

Silenciamiento de YME1L1 mediante shRNA en células Huh-7

Para evaluar la posible función de YME1L1 en la infección por DENV se estandarizó el ensayo de silenciamiento, para lo cual se consideraron distintos tiempos post transfección y concentraciones del plásmido a transfectar con la finalidad de buscar las condiciones más adecuadas para el silenciamiento.

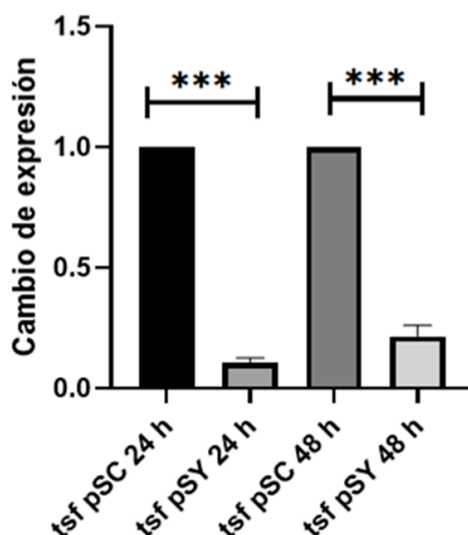


Fig. 27. Expresión relativa de YME1L1 en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1. Los extractos de RNA total de células transfectadas y no infectadas a las 24 o 48 h post-transfección, se utilizaron para la amplificación de YME1L1 utilizando a los RNAm de GAPDH y RNAr 18S como genes de expresión constitutiva para la normalización de los datos. Se utilizó pSH-SCRAMBLED como control de transfección. Los resultados corresponden a al menos tres experimentos independientes con sus respectivas réplicas técnicas. Las barras representan la media $\pm$ SD de tres experimentos

independientes cuyos valores se calcularon utilizando la prueba de ANOVA. Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.001$ (***).

Posteriormente se cosecharon las células y se purificó el RNA total con la finalidad de determinar el nivel de expresión de YME1L1 mediante RT-qPCR. Las condiciones más efectivas para el silenciamiento utilizadas en este ensayo fueron usando 2.28 ng/μl (800ng total) de los plásmidos pSH-YME1L1 y pSH-SCRAMBLED a las 24 o 48 h post transfección. Como se pudo observar en la figura 27, la expresión de *YME1L1* en las células transfectadas con pSH-YME1L1 disminuyó un 88% y 78% a las 24 y 48 h post transfección respectivamente, con respecto a las células control transfectadas con pSH-SCRAMBLED.

Adicionalmente y con la finalidad de confirmar los resultados de la expresión de *YME1L1* por RT-qPCR se procedió a realizar ensayos de inmunofluorescencia para la detección de YME1L1 en las condiciones de silenciamiento establecidas mediante el ensayo anterior. En la figura 28 se puede observar que en las condiciones de silenciamiento las células presentaron una señal significativamente menor cuando se transfectaron con pSH-YME1L1 cuya disminución en el nivel de esta proteína resultó del 40%, 24% y 20% a las 24, 48 y 72 h post transfección, respectivamente, cuando se compararon con las transfectadas con pSH-SCRAMBLED.

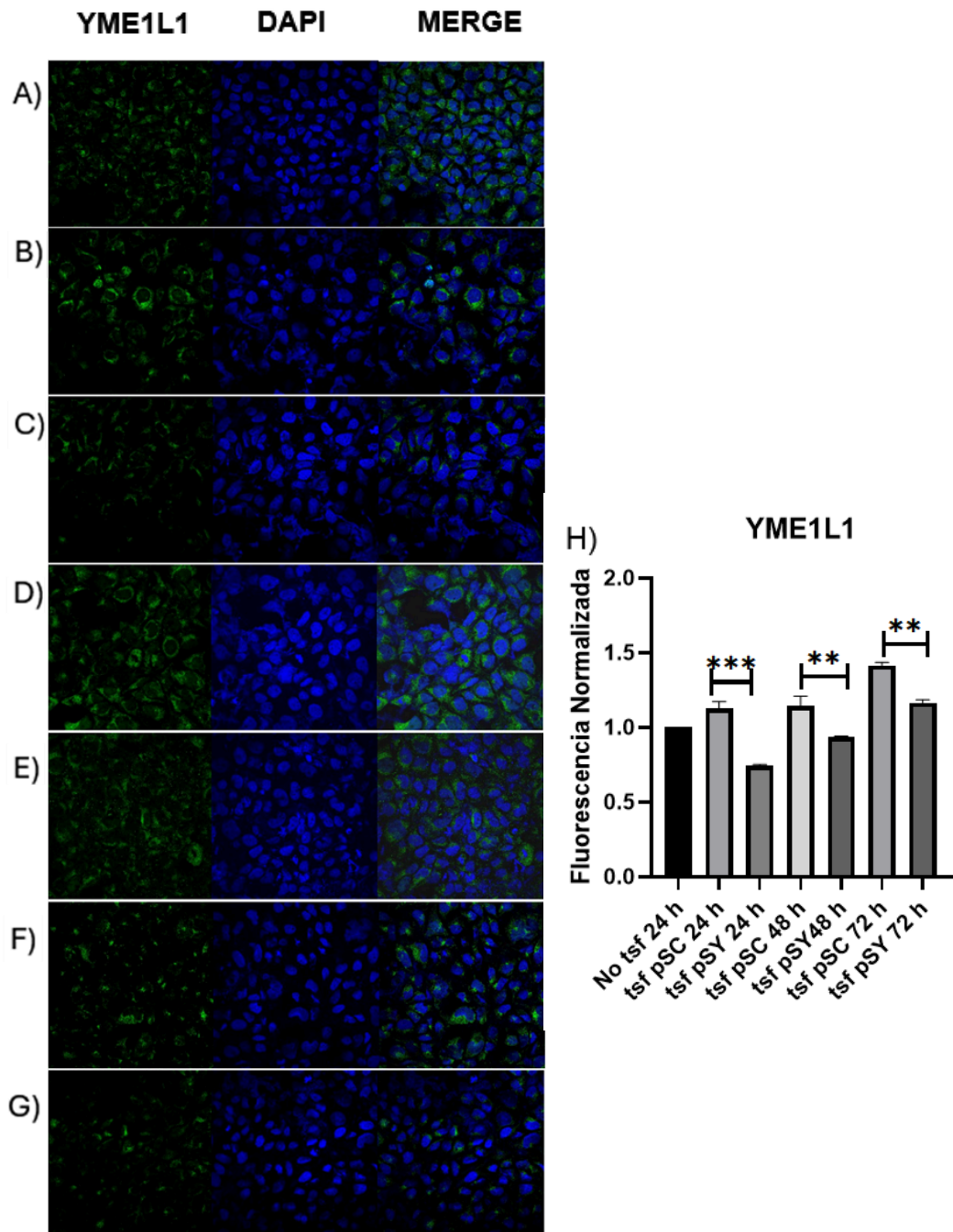


Fig. 28. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células transfectadas con pSH-YME1L1. Imágenes representativas de células Huh-7 no transfectadas (A), células transfectadas con pSH-SCRAMBLED (B, D y F) o con pSH-YME1L1 (C, E y G) a las 24, 48 y 72 h post-transfección respectivamente. (H) Gráfica de fluorescencia normalizada para las condiciones antes mencionadas, los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes usando el programa Fiji image versión 2.14 y una prueba de ANOVA (GraphPad Prism v8.0.2). Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y YME1L1 se detectó mediante un anticuerpo Anti-YME1L1 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde). Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV4000 con el objetivo 60X.

Estos resultados, en conjunto, confirmaron que las condiciones usadas para el silenciamiento de YME1L1 en las células Huh-7 fueron las adecuadas. De esta manera se procedió a la siguiente etapa del proyecto que consistió en determinar los efectos del silenciamiento de YME1L1 en la infección por DENV.

Efecto del silenciamiento de *YME1L1* en la infección por DENV

Con la finalidad de determinar el efecto del silenciamiento de YME1L1 en la infección por dengue se realizaron ensayos de transfección usando pSH-YME1L1 y pSH-SCRAMBLED como control y después de 24 h se lleva a cabo la infección con DENV-2 a una MOI de 0.1 para proceder a cosechar las células tratadas a las 24 y 48 h post transfección. Enseguida se realizó un extracto de RNA total para determinar la abundancia del genoma viral mediante RT-qPCR. El silenciamiento de la proteína de interés produjo un aumento en la cantidad del genoma viral de 6.5 veces y 1.8 veces a las 24 h y 48 h post infección, usando GAPDH y RNAr 18S como controles de normalización y a las células transfectadas con pSH-SCRAMBLED como control (Fig. 29).

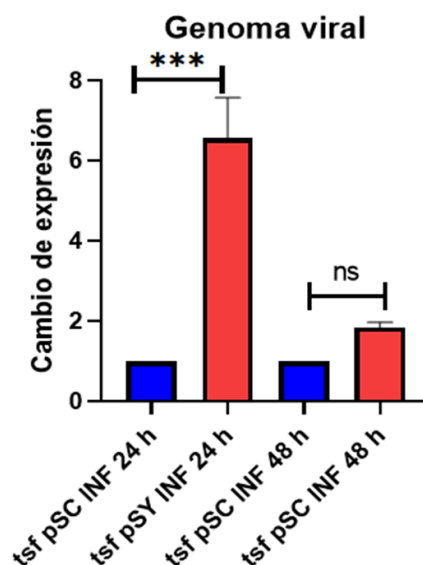


Fig. 29. Expresión relativa del genoma viral en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas con DENV-2. Los extractos de RNA total de células transfectadas por 24 h e infectadas a una MOI de 0.1 por 24 h y 48 h, se utilizaron para la amplificación del genoma viral utilizando iniciadores dirigidos a la región codificante para NS5 y como genes de expresión constitutiva a GAPDH y RNAr 18S para la normalización de los datos. Los controles del experimento se realizaron en células transfectadas con pSH-SCRAMBLED infectados en las condiciones descritas anteriormente. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes con sus respectivas réplicas técnicas. Las barras representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes cuyos valores se calcularon utilizando la prueba de ANOVA (GraphPad Prism v8.0.2). Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.001$ (***).

Por otro lado, se realizaron ensayos de RT-qPCR en los cuales se verificó que el nivel de expresión de YME1L1 en las células transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas se encontraba disminuido con respecto a los controles. Como se pudo observar en la figura 30, el nivel de expresión de dicha proteína en las células “silenciadas” para YME1L1 e infectadas se encontraba disminuido en aproximadamente 44% y 40% a las 24 y las 48 h post infección, respectivamente; esto cuando se comparan los resultados usando extractos de las células transfectadas con pSH-SCRAMBLED en las mismas condiciones de infección.

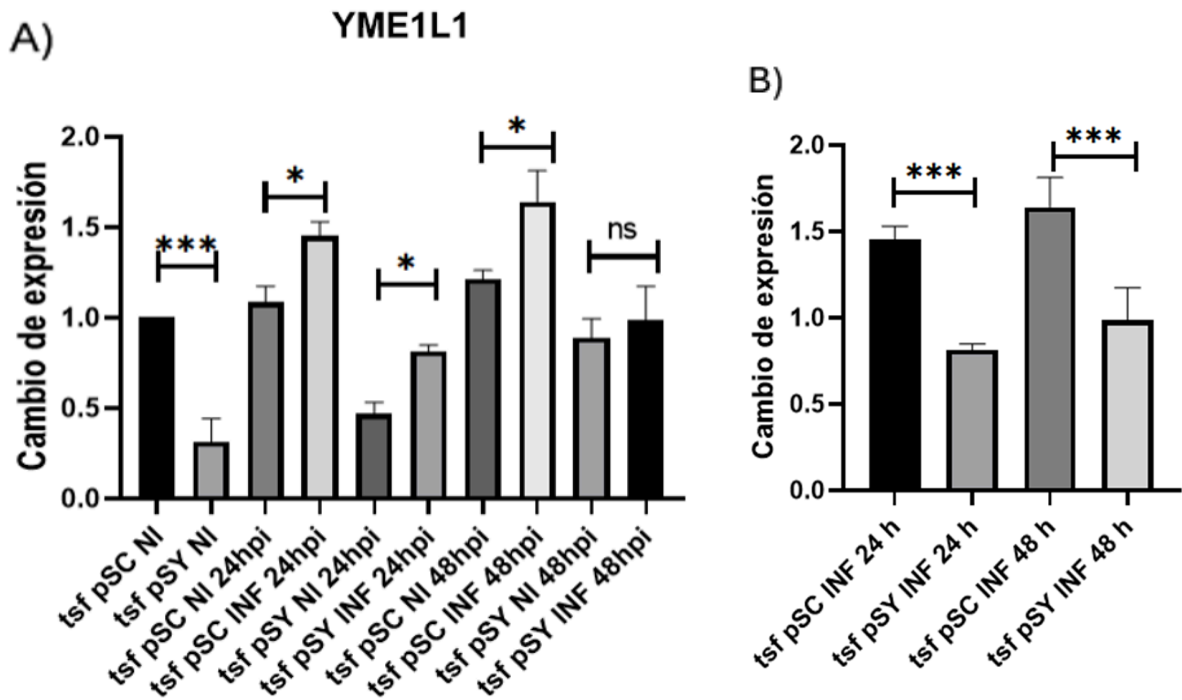


Fig. 30. Expresión relativa de *YME1L1* en células Huh-7 transfectadas con pSH-*YME1L1* e infectadas con DENV-2. A) Gráfica de la expresión relativa de células transfectadas por 24 h y no infectadas o infectadas por 24 h y 48 h. B) Gráfica de la expresión relativa de células transfectadas e infectadas por 24 h y 48 h. Los extractos de RNA total de células transfectadas por 24 h e infectadas por 24 h y 48 h, se utilizaron para la amplificación de *YME1L1* utilizando a los RNAm de GAPDH y RNAr 18S como genes de expresión constitutiva para la normalización de los datos. Se utilizó pSH-SCRAMBLED como control de transfección. Los resultados corresponden a al menos tres experimentos independientes con sus respectivas réplicas técnicas. Las barras representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes cuyos valores se calcularon utilizando la prueba de ANOVA (GraphPad Prism v8.0.2). Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

Con el propósito de corroborar los resultados de RT-qPCR se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la abundancia de la proteína viral NS1 en condiciones de silenciamiento de *YME1L1*. Los resultados se muestran en la figura 31, en donde se observó que en las células transfectadas con pSH-*YME1L1* e infectadas con DENV-2 a una MOI de 0.1 presentaron un aumento de 40 % y 30 % veces a las 24 y 48 h post infección respectivamente cuando se compararon con las células en las mismas condiciones pero transfectadas con pSH-SCRAMBLED.

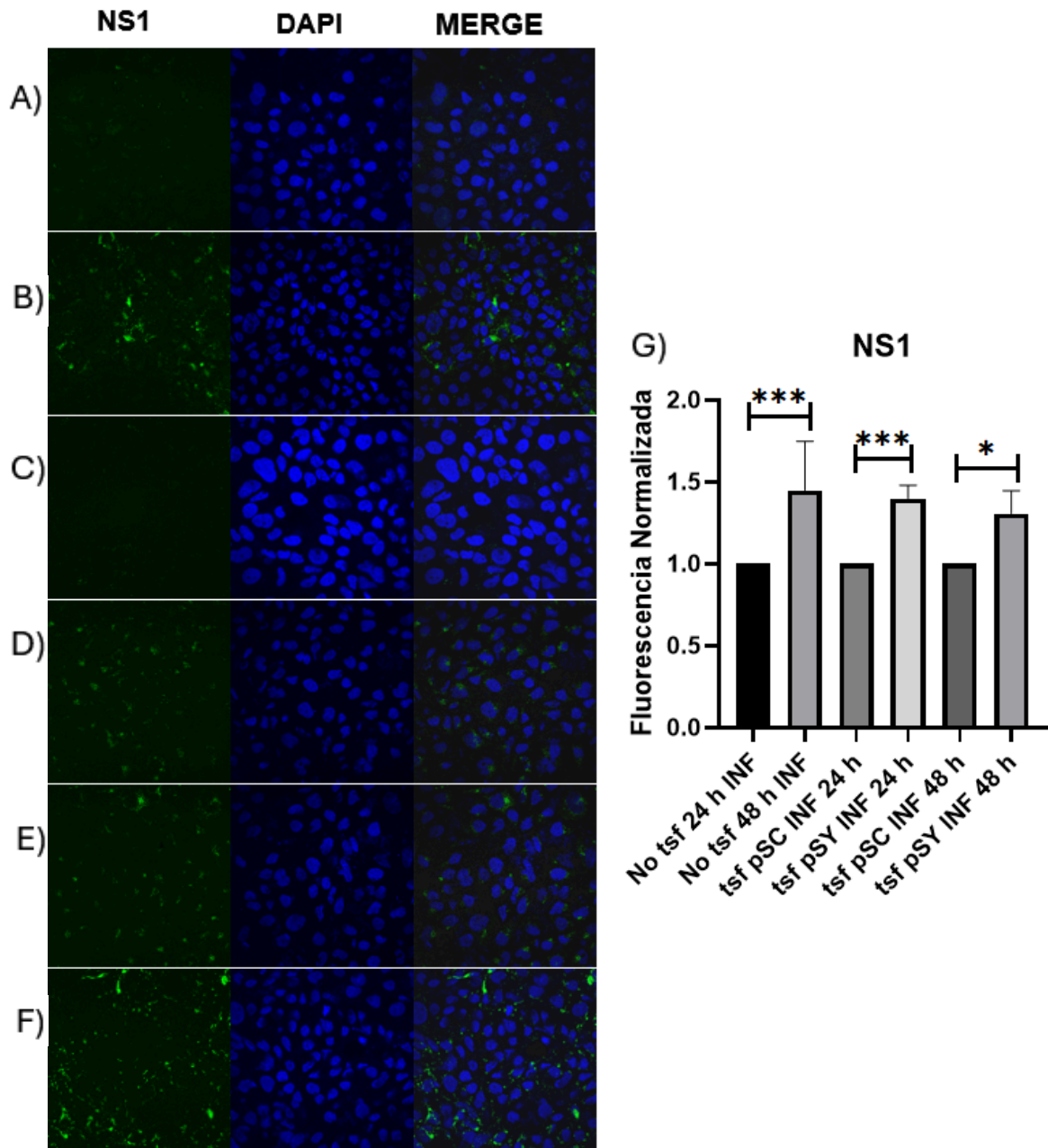


Fig. 31. Detección de la proteína NS1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas con DENV-2. Imágenes representativas de células Huh-7 transfectadas por 24 h con pSH-SCRAMBLED (C y E) o pSH-YME1L1 (D y F) e infectadas a una MOI de 0.1 por 24 h (C y D) o 48 h (E y F). Los controles con células infectadas por 24 h y 48 h sin transfectar se muestran en A y B, respectivamente. G) Gráfica de fluorescencia normalizada para las condiciones antes mencionadas, los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes para lo cual se utilizó el programa Fiji image versión 2.14 y una prueba de ANOVA (GraphPad Prism v8.0.2). Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (***). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y NS1 se detectó mediante un anticuerpo Anti-NS1 y un

anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde); Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes y se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV4000 con el objetivo 60X.

Asimismo, con la finalidad de comprobar que en las células “silenciadas” se mantenía disminuida la expresión de YME1L1 en las condiciones de infección se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para la detección de esta proteína usando microscopía confocal. Como se puede apreciar en la figura 32, las células transfectadas con pSH-YME1L1 presentaron una disminución en la señal de YME1L1 de 43% y 12% a las 24 y 48 h post infección a comparación con las células transfectadas con pSH-SCRAMBLED en las mismas condiciones de infección.

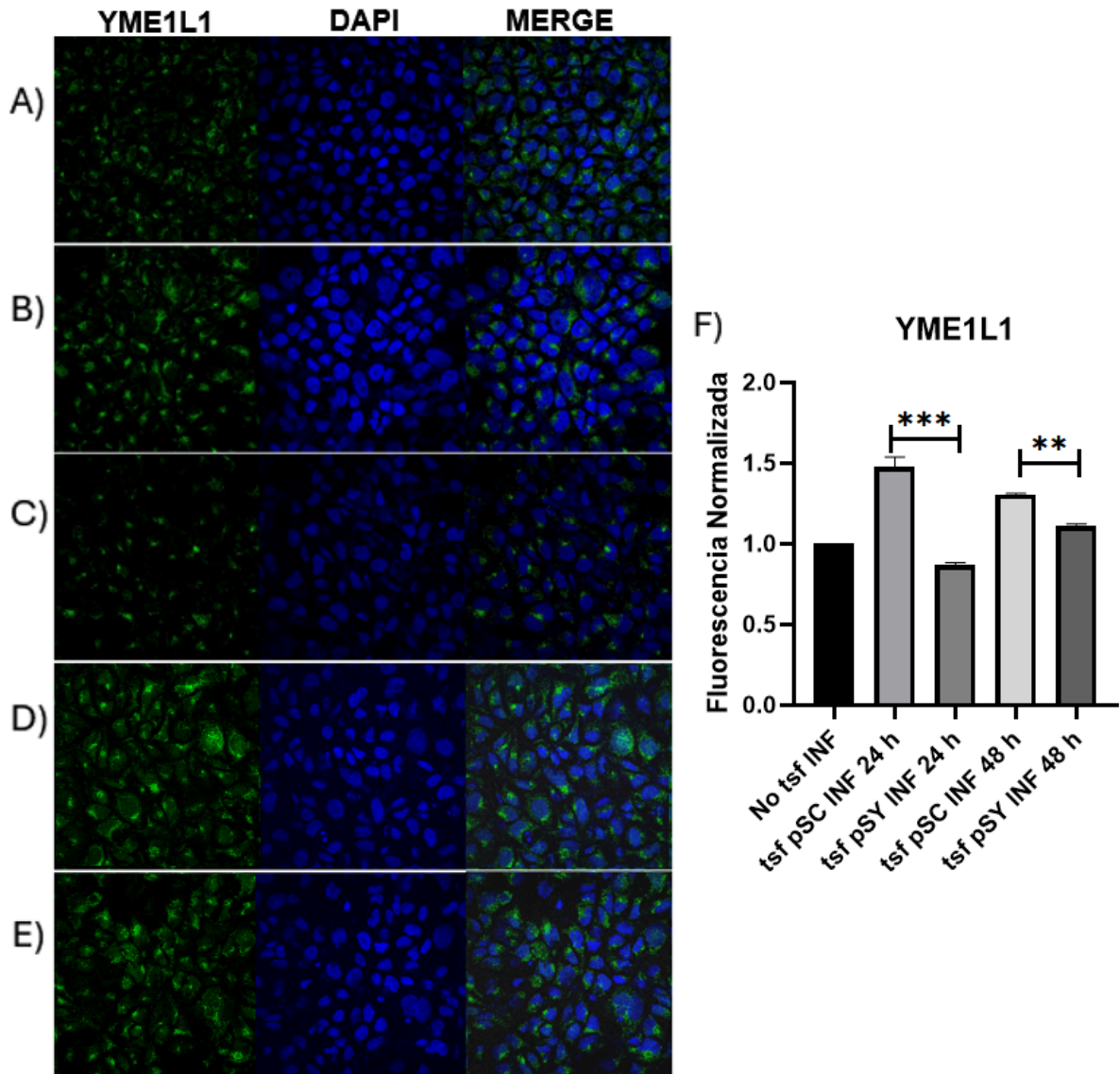


Fig. 32. Detección de la proteína YME1L1, mediante inmunofluorescencia, en células Huh-7 transfectadas con pSH-YME1L1 e infectadas con DENV-2. Imágenes representativas de células Huh-7 transfectadas por 24 h con pSH-SCRAMBLED (B y D) o con pSH-YME1L1 (C y E) e infectadas con DENV-2 a una MOI de 0.1 por 24 h (B y C) o 48 h (D y E). Las células infectadas sin transfectar se muestran en A. (F) Gráfica de fluorescencia normalizada para las condiciones antes mencionadas, los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes para lo cual se utilizó el programa Fiji image versión 2.14 y una prueba de ANOVA (GraphPad Prism versión 8.0.2). Los valores de significancia estadística que se muestran corresponden a una $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y YME1L1 se detectó mediante un anticuerpo Anti-YME1L1 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde); Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV4000 con el objetivo 60X.

Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que existe una fuerte correlación entre una baja expresión de YME1L1 y un aumento en la infección por DENV, lo que nos sugiere que esta importante proteína de membrana interna mitocondrial controla procesos importantes en la respuesta ante la infección por este arbovirus.

DISCUSIÓN

El DENV es un arbovirus que circula de manera endémica en nuestro país así como en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Este virus es uno de los patógenos de mayor importancia a nivel de salud pública ya que se registran 7.6 millones casos de infecciones por este virus al año en el mundo y no existe un tratamiento eficaz contra esta enfermedad (World Health Organization, 2024). En consecuencia la OMS y los gobiernos de muchos países del mundo dirigen sus esfuerzos para apoyar iniciativas científicas que buscan tratamientos efectivos y mejores vacunas a través del estudio de vías de señalización e interacciones moleculares que pudieran realizar un papel importante en la replicación, síntesis de proteínas y entrada del virus.

En el presente trabajo nos interesa adentrarnos en la investigación de los mecanismos básicos que utiliza el DENV para establecer una infección exitosa y el papel que podrían estar cumpliendo las mitocondrias así como las proteínas y las funciones asociadas a éstas en la replicación de este patógeno.

En investigaciones previas se ha demostrado que durante la infección por DENV las mitocondrias sufren daños que pueden contribuir a la patogénesis, hiperinflamación y muerte de las células infectadas por su incapacidad de mantener un control de calidad mitocondrial (segregación y eliminación de mitocondrias dañadas), mitofagia y metabolismo energético (Disha et al., 2024).

Esta investigación se enfocó en determinar el efecto de la metaloproteasa de membrana interna mitocondrial YME1L1 en la infección por DENV en células humanas, ya que se ha determinado que esta proteína tiene la capacidad de incidir en la morfología, dinámica, control de calidad, proteostasis y funciones mitocondriales (Anand et al., 2014)(Ohba et al., 2020)(Zhou et al., 2023), las cuales son también modificadas durante la infección con este virus.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestra que durante el proceso de infección por DENV en la línea celular Huh-7, la expresión de YME1L1, tanto en RNAm y proteína, se ve aumentada de manera significativa en células infectadas, lo

cual puede estar asociado a la replicación viral. Cabe mencionar que existen investigaciones previas en las que se determinó que esta proteína se incrementa durante la infección por DENV. La investigación bibliográfica y el interactoma *in silico* que realizamos antes de iniciar el presente proyecto así como los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer que uno de los mecanismos de modulación de la expresión de esta proteína podría estar mediado por los miRNAs, y en específico el hsa-mir-383-3p y hsa-mir-151b que disminuyen su expresión durante la infección por DENV y que tienen como blanco putativo al RNAm de YME1L1 (Rajput et al., 2020; Saini et al., 2020).

Los reportes previos indican que YME1L1 es una proteína que se encuentra en la membrana interna mitocondrial cuyas funciones se centran en la regulación de diversos procesos esenciales para la mitocondria, siendo uno de éstos la dinámica mitocondrial. Este proceso es indispensable en el reciclamiento y control de calidad mitocondrial, en el cual YME1L1 procesa a OPA1 llevándola a su activación para comenzar la fusión mitocondrial y mantener así un equilibrio en la dinámica mitocondrial contribuyendo con esto a la segregación de mitocondrias dañadas, al mantenimiento del número de mitocondrias y la funcionalidad de éstas en la célula. En condiciones de estrés se ha reportado que YME1L1 es degradado, lo cual lleva a la activación de otra proteasa mitocondrial conocida como OMA1 la cual cumple el mismo papel de YME1L1, pero escindiendo a OPA1 en un sitio distinto, de manera que OMA1 se ha asociado a un incremento en la apoptosis como parte de la respuesta al estrés (Anand et al., 2014). Por todo lo anterior, el aumento en la expresión de YME1L1, especialmente en tiempos tempranos de la infección, podría conferir supervivencia celular provocando una mayor fusión mitocondrial para tratar de modular el daño ocasionado por la infección mediante el intercambio de materiales como DNA, proteínas y metabolitos con mitocondrias sanas, sin embargo esto podría disminuir la respuesta inmune innata antiviral mediada por MAVS, permitiendo la evasión de la respuesta inmune por parte del virus, lo cual podría favorecer la infección.

Como se mostró en los resultados, el silenciamiento de *YME1L1* en células Huh-7 se realizó mediante la construcción de un plásmido que expresa un shRNA dirigido contra este RNAm, con lo cual se disminuyó el nivel de expresión de esta molécula con la finalidad de determinar su posible función durante la infección. Así, los experimentos de silenciamiento de *YME1L1* e infección con DENV nos permitieron observar un aumento en el genoma viral y la proteína viral NS1 a través de ensayos de RT-qPCR e inmunofluorescencia. Los resultados también nos indican una correlación entre el nivel de silenciamiento de *YME1L1* y el aumento en la replicación viral, ya que a las 24 h de infección hay un mayor nivel de silenciamiento y un mayor efecto en la replicación viral. Estos resultados sugieren que *YME1L1* juega un papel importante en la regulación mitocondrial frente a la infección por este virus, probablemente debido a sus funciones como mediadora de la respuesta mitocondrial al estrés para aumentar la supervivencia de las células bajo condiciones no favorables y limitar la multiplicación de este virus.

El estrés celular ocasionado por la infección por DENV podría llevar a un aumento de la expresión de *YME1L1* y así promover la fusión mitocondrial; a este respecto se han publicado artículos que describen que la infección por este virus induce un aumento en la fusión mitocondrial, por lo que esta proteína podría estar influyendo en la dinámica y morfología mitocondrial (Chatel-Chaix et al., 2016; Barbier et al., 2016). De manera contraria, se ha publicado que en células de cerdo que han sido silenciadas para *YME1L1* se ha visto que Drp1 aumenta, lo cual promueve una mayor fisión mitocondrial, de tal manera que probablemente el aumento de *YME1L1* podría propiciar una disminución de Drp1, lo cual lleva a una mayor fusión mitocondrial (Zhou et al., 2023).

Por otro lado, en el contexto experimental del silenciamiento de *YME1L1* durante la infección por DENV podríamos plantear que la disminución de la expresión de *YME1L1* podría inducir mayor fisión mitocondrial, lo cual podría promover la mitofagia. Con respecto a la mitofagia, se ha descrito que la infección por DENV induce la inhibición de este proceso debido a que se inhibe la expresión de PINK/parkin de manera que se presenta un control de calidad mitocondrial

defectuoso, ya que a pesar de haber daño mitocondrial y necesidad de realizar mitofagia, el virus inhibe este proceso, lo cual promueve la replicación viral (Singh et al., 2022). Por lo anteriormente mencionado se podría proponer que, el aumento de fisión mitocondrial ocasionado por el silenciamiento de *YME1L1* y la inhibición de la mitofagia por el virus promueven una mayor infección viral. Adicionalmente, se ha postulado que la conservación de mitocondrias disfuncionales en la infección por este virus (inhibición de la mitofagia) podría aumentar la liberación de DNAm^t, que funge como un excelente inductor de la respuesta proinflamatoria, frecuentemente encontrada en los casos de dengue grave (Singh et al., 2022).

Entonces *YME1L1* puede funcionar como una proteína con funciones antivirales debido a su importancia en el mantenimiento de la biogénesis y dinámica mitocondrial, lo cual podría afectar negativamente a la replicación del DENV pues la infección por este virus se ha visto favorecida en condiciones de mitocondrias disfuncionales.

YME1L1 no solo cumple un papel en la dinámica mitocondrial, ya que se ha descrito que desempeña una actividad importante en la translocación de proteínas a la mitocondria, pues se postula que puede degradar proteínas estancadas en el complejo TOM o los mismos complejos de TIM, como TIM23, que no se estén utilizando. Esto permite que haya un mejor control de calidad de las proteínas que deben ser internalizadas a la mitocondria y que el proceso de la importación sea más eficiente (Hsu et al., 2025). En este sentido también se ha descrito que *YME1L1* participa en la regulación de TIM17A, la cual es parte de la translocasa de membrana mitocondrial interna TIMM23. TIMM23 juega un papel importante en el transporte de proteínas del espacio intermembranal mitocondrial hacia la matriz mitocondrial, donde *YME1L1* puede degradar a TIM17A en condiciones normales, sin embargo bajo estrés mitocondrial, *YME1L1* se ve disminuido y por ende se da un aumento de TIMM17A, lo cual se ha correlacionado a un aumento en la apoptosis celular asociado al estrés (Rainbolt et al., 2013).

Por lo anteriormente mencionado, en el contexto de la infección por DENV, el aumento de *YME1L1* podría afectar la translocación de proteínas a la mitocondria, lo

cual podría aumentar la capacidad de la célula para hacer frente a la infección, influyendo en los procesos gobernados por la mitocondria como la disminución del estrés oxidativo, modulación del metabolismo de lípidos, la fosforilación oxidativa, síntesis de ATP así como la apoptosis. Es importante recalcar que hace falta conocer más a fondo las funciones que ejerce YME1L1 en este organelo en el contexto de la infección por DENV, por ejemplo cómo influye esta proteína en la mitofagia, respuesta inmune innata, estrés oxidativo, en el cambio metabólico, entre otros.

CONCLUSIONES

YME1L1 es una proteína de membrana interna mitocondrial que tiene funciones muy importantes en la dinámica y morfología mitocondrial así como en la translocación de proteínas a este organelo. Las repercusiones del papel de YME1L1 podrían alcanzar procesos como la modulación de la fisión, fusión, mitofagia, apoptosis, proteostasis, estrés oxidativo, metabolismo energético, entre otros. En este trabajo se obtuvieron resultados que indican que YME1L1 podría estar funcionando como un factor antiviral que permite la inhibición de la multiplicación viral en tiempos tempranos de la infección.

En la infección por DENV, el incremento de YME1L1 puede conferir protección a la apoptosis en respuesta al estrés promoviendo la fusión mitocondrial y ayudando a mantener el equilibrio en la dinámica mitocondrial durante la infección para evitar en lo posible la generación de mitocondrias disfuncionales.

Estos hallazgos nos permiten vislumbrar la importancia de las funciones mitocondriales durante la infección por lo que el estudio de sus implicaciones en el ciclo replicativo viral, la respuesta inmune innata y la patogenia de este virus son algunas de las perspectivas del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acrani, G. O., Gomes, R., Proença-Módena, J. L., da Silva, A. F., Oliveira Carminati, P., Silva, M. L., Santos, R. I. M., & Arruda, E. (2010). Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Research*, 149(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2009.12.013>
2. Agarwal, A., Alam, M. F., Basu, B., Pattanayak, S., Asthana, S., Syed, G. H., Kalia, M., & Vratil, S. (2022). Japanese Encephalitis Virus NS4A Protein Interacts with PTEN-Induced Kinase 1 (PINK1) and Promotes Mitophagy in Infected Cells. *Microbiology Spectrum*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.00830-22>
3. Agnihothram, S., Menachery, V. D., Yount, B. L., Lindesmith, L. C., Scobey, T., Whitmore, A., Schäfer, A., Heise, M. T., & Baric, R. S. (2018). Development of a Broadly Accessible Venezuelan Equine Encephalitis Virus Replicon Particle Vaccine Platform. *Journal of Virology*, 92(11). <https://doi.org/10.1128/jvi.00027-18>
4. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
5. Anand, R., Wai, T., Baker, M. J., Kladt, N., Schauss, A. C., Rugarli, E., & Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of Cell Biology*, 204(6), 919. <https://doi.org/10.1083/JCB.201308006>
6. Aynekulu Mersha, D. G., van der Sterren, I., van Leeuwen, L. P. M., Langerak, T., Hakim, M. S., Martina, B., van Lelyveld, S. F. L., & van Gorp, E. C. M. (2024). The role of antibody-dependent enhancement in dengue vaccination. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S40794-024-00231-2>

7. Barbier, V., Lang, D., Valois, S., Rothman, A. L., & Medin, C. L. (2016). Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology*, 500, 149. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2016.10.022>
8. Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, 118(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
9. Boland, A. J., O’Kane, A. A., Buick, R., Longley, D. B., & Scott, C. J. (2021). Antibody therapy in pancreatic cancer: mAb-ye we’re onto something? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1876(1), 188557. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2021.188557>
10. Bonezi, V., Cataneo, A. H. D., Branquinho, M. S. F., Silva, M. B. B., Gonzalez-Dias, P., Pereira, S. S., Ferreira, L. C. d. S., Nakaya, H. I., Campa, A., Wowk, P. F., & Silveira, E. L. V. (2020). Flavivirus-Mediating B Cell Differentiation Into Antibody-Secreting Cells in Humans Is Associated With the Activation of the Tryptophan Metabolism. *Frontiers in Immunology*, 11, 20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00020>
11. Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C. J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host & Microbe*, 20(3), 342. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2016.07.008>
12. Chen, R. F., Yang, K. D., Lee, I. K., Liu, J. W., Huang, C. H., Lin, C. Y., Chen, Y. H., Chen, C. L., & Wang, L. (2014). Augmented miR-150 expression associated with depressed SOCS1 expression involved in dengue haemorrhagic fever. *Journal of Infection*, 69(4), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.05.013>

13. Ding, B., Zhang, L., Li, Z., Zhong, Y., Tang, Q., Qin, Y., & Chen, M. (2017). The Matrix Protein of Human Parainfluenza Virus Type 3 Induces Mitophagy that Suppresses Interferon Responses. *Cell Host and Microbe*, 21(4), 538-547.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.004>
14. Disha, B., Mathew, R. P., Dalal, A. B., Mahato, A. K., Satyamoorthy, K., Singh, K. K., Thangaraj, K., & Govindaraj, P. (2024). Mitochondria in biology and medicine – 2023. *Mitochondrion*, 76, 101853. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2024.101853>
15. Elesela, S., & Lukacs, N. W. (2021). Role of Mitochondria in Viral Infections. *Life* 2021, Vol. 11, Page 232, 11(3), 232. <https://doi.org/10.3390/LIFE11030232>
16. Emara, M. M., & Brinton, M. A. (2007). Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 9041. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0703348104>
17. García Rodríguez, G., Francisco, J., Pedroza, R., Yaneth, D., Santiago, F. L., María, D., Soto, N. C., Alejandra, D., Mugica Martínez, M., Michael, M., De La, M., & Pantoja, C. (n.d.). *DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA*.
18. GraphPad Software. (2025). *GraphPad Prism* (versión 8.0.1) [Computer software]. <https://www.graphpad.com/>
19. Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A minireview. In *Viruses* (Vol. 12, Issue 8, p. 829). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12080829>
20. Hapugaswatta, H., Amarasena, P., Premaratna, R., Seneviratne, K. N., & Jayathilaka, N. (2020). Differential expression of microRNA, miR-150 and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in peripheral blood cells as early prognostic markers of severe forms of dengue. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 25. <https://doi.org/10.1186/S12929-020-0620-Z>

21. He, J., Shangguan, X., Zhou, W., Cao, Y., Zheng, Q., Tu, J., Hu, G., Liang, Z., Jiang, C., Deng, L., Wang, S., Yang, W., Zuo, Y., Ma, J., Cai, R., Chen, Y., Fan, Q., Dong, B., Xue, W., ... Cheng, J. (2021). Glucose limitation activates AMPK coupled SENP1-Sirt3 signalling in mitochondria for T cell memory development. *Nature Communications*, 12(1), Article 174. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24619-2>
22. He, Z., Zhu, X., Wen, W., Yuan, J., Hu, Y., Chen, J., An, S., Dong, X., Lin, C., Yu, J., Wu, J., Yang, Y., Cai, J., Li, J., & Li, M. (2016). Dengue virus subverts host innate immunity by targeting adaptor protein MAVS. *Journal of Virology*, 90(16), 7219–7230. <https://doi.org/10.1128/JVI.00221-16>
23. Heaton, N. S., & Randall, G. (2010). Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host & Microbe*, 8(5), 422–432. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.006>
24. Henchal, E. A., & Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(4), 376–396. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.4.376>
25. Hsu, M. C., Kinefuchi, H., Lei, L., Kikuchi, R., Yamano, K., & Youle, R. J. (2025). Mitochondrial YME1L1 governs unoccupied protein translocase channels. *Nature Cell Biology*, 27(2), 309–321. <https://doi.org/10.1038/S41556-024-01571-Z>
26. Hwang, E. H., Kim, G., Oh, H., An, Y. J., Kim, J., Kim, J. H., Hwang, E. S., Park, J. H., Hong, J. J., & Koo, B. S. (2020). Molecular and evolutionary analysis of dengue virus serotype 2 isolates from Korean travelers in 2015. *Archives of Virology*, 165(8), 1739. <https://doi.org/10.1007/S00705-020-04653-Z>
27. Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., & Young, H. A. (2000). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*, 164(7), 3596–3599. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3596>
28. ICREA, CEAB-CSIC, & CREA. (n.d.). *Dengue - Mosquito Alert*. Mosquito Alert. Retrieved July 31, 2025, from <https://www.mosquitoalert.com/dengue/>

29. Kato, F., & Hishiki, T. (2016). Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. *Viruses*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/V8050122>
30. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Waterhouse, A., Procter, J. B., Martin, D., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009).
31. Kim, S. J., Syed, G. H., Khan, M., Chiu, W. W., Sohail, M. A., Gish, R. G., & Siddiqui, A. (2014). Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), 6413–6418. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1321114111>
32. Lee, J. K., & Shin, O. S. (2023). Zika virus modulates mitochondrial dynamics, mitophagy, and mitochondria-derived vesicles to facilitate viral replication in trophoblast cells. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1203645>
33. Lee, M. F., Long, C. M., & Poh, C. L. (2025). Current status of the development of dengue vaccines. *Vaccine: X*, 22, 100604. <https://doi.org/10.1016/J.JVACX.2024.100604>
34. López-Solís, A. D., Castillo-Vera, A., Cisneros, J., Solís-Santoyo, F., Penilla-Navarro, R. P., IV, W. C. B., Torres-Estrada, J. L., Rodríguez, A. D., López-Solís, A. D., Castillo-Vera, A., Cisneros, J., Solís-Santoyo, F., Penilla-Navarro, R. P., IV, W. C. B., Torres-Estrada, J. L., & Rodríguez, A. D. (2020). Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México. *Salud Pública de México*, 62(4), 439–446. <https://doi.org/10.21149/10131>

35. Marceau, C. D., Puschnik, A. S., Majzoub, K., Ooi, Y. S., Brewer, S. M., Fuchs, G., Swaminathan, K., Mata, M. A., Elias, J. E., Sarnow, P., & Carette, J. E. (2016). Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature*, 535(7610), 159–163. <https://doi.org/10.1038/nature18631>
36. Masyeni, S.Masyeni, S., Hadi, U., Kuntaman, Yohan, B., Margyaningsih, N. I., & Sasmono, R. T. (2018). Detection of micro RNA hsa-let-7e in peripheral blood mononuclear cells infected with dengue virus serotype-2: preliminary study. IOP Conference Series: 012010. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/125/1/012010>
37. Nasar, S., Rashid, N., & Iftikhar, S. (2020). Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. *Journal of Medical Virology*, 92(8), 941–955. <https://doi.org/10.1002/JMV.25646>
38. Nelemans, T., Tas, A., Kikkert, M., & van Hemert, M. J. (2024). Usutu virus NS4A suppresses the host interferon response by disrupting MAVS signaling. *Virus Research*, 347, 199431. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2024.199431>
39. OMS. (2009). DENGUE GUIAS PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology*, 170. <https://doi.org/10.3109/01674820209042792>
40. Ohba, Y., MacVicar, T., & Langer, T. (2020). Regulation of mitochondrial plasticity by the i-AAA protease YME1L. *Biological Chemistry*, 401(6–7), 877–890. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2020-0120>
41. OMS. (2018). *Guía_bolsillo.pdf*.
42. Onoguchi, K., Onomoto, K., Takamatsu, S., Jogi, M., Takemura, A., Morimoto, S., Julkunen, I., Namiki, H., Yoneyama, M., & Fujita, T. (2010). Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1001012>

43. Opalińska, M., & Jańska, H. (2018). AAA Proteases: Guardians of Mitochondrial Function and Homeostasis. *Cells*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/CELLS7100163>
44. Organización Panamericana de la Salud. (2024). Informe de la situación epidemiológica del dengue en las Américas. *Ops*, 237, 14–16. <https://www.paho.org/plisa>
45. Ouyang, X., Jiang, X., Gu, D., Zhang, Y., Kong, S. K., Jiang, C., & Xie, W. (2016). Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. *International Journal of Medical Sciences*, 13(3), 195. <https://doi.org/10.7150/IJMS.13996>
46. Pando, V. (2023). *Vacuna contra el dengue: una herramienta adicional para la prevención*. Institución Nacional de Salud Pública. <https://www.insp.mx/informacion-relevante/vacuna-contra-el-dengue-una-herramienta-adicional-para-la-prevencion>
47. Pfanner, N., den Brave, F., & Becker, T. (2025). Mitochondrial protein import stress. *Nature Cell Biology* 2025 27:2, 27(2), 188–201. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01590-w>
48. Rainbolt, T. K., Atanassova, N., Genereux, J. C., & Wiseman, R. L. (2013). Stress-regulated translational attenuation adapts mitochondrial protein import through Tim17A degradation. *Cell Metabolism*, 18(6), 908–919. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.006>
49. Rajput, R., Sharma, J., Nair, M. T., Khanna, M., Arora, P., & Sood, V. (2020). Regulation of Host Innate Immunity by Non-Coding RNAs During Dengue Virus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 588168. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.588168>
50. Ren, Z., Ding, T., Zuo, Z., Xu, Z., Deng, J., & Wei, Z. (2020). Regulation of MAVS Expression and Signaling Function in the Antiviral Innate Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 11, 1030. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01030>

51. Roche Registration GmbH. (2014). Anexo I: Ficha técnica o resumen de las características del producto 1. *Agencia Europea de Medicamentos*, 1–33. ec.europa.eu/health/documents/community.../anx_130850_es.pdf
52. Saini, J., Bandyopadhyay, B., Pandey, A. D., Ramachandran, V. G., Das, S., Sood, V., Banerjee, A., & Vratil, S. (2020). High-Throughput RNA Sequencing Analysis of Plasma Samples Reveals Circulating microRNA Signatures with Biomarker Potential in Dengue Disease Progression. *MSystems*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00724-20>
53. Saito, T., & Gale, M. (2008). Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1523. <https://doi.org/10.1084/JEM.20081210>
54. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
55. Shah, P. S., Link, N., Jang, G. M., Sharp, P. P., Zhu, T., Swaney, D. L., Johnson, J. R., Von Dollen, J., Ramage, H. R., Satkamp, L., Newton, B., Hüttenhain, R., Petit, M. J., Baum, T., Everitt, A., Laufman, O., Tassetto, M., Shales, M., Stevenson, E., ... Krogan, N. J. (2018). Comparative flavivirus-host protein interaction mapping reveals mechanisms of dengue and Zika virus pathogenesis. *Cell*, 175(7), 1931. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.11.028>
56. SINAVE. (2024). *PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE DENGUE*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/964524/Pano_dengue__SE_52.pdf

57. Singh, B., Avula, K., Sufi, S. A., Parwin, N., Das, S., Alam, M. F., Samantaray, S., Bankapalli, L., Rani, A., Poornima, K., Prusty, B., Mallick, T. P., Shaw, S. K., Dodia, H., Kabi, S., Pagad, T. T., Mohanty, S., & Syed, G. H. (2022). Defective Mitochondrial Quality Control during Dengue Infection Contributes to Disease Pathogenesis. *Journal of Virology*, 96(20). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.00828-22>
58. Sorouri, M., Chang, T., & Hancks, D. C. (2022). Mitochondria and Viral Infection: Advances and Emerging Battlefronts. *MBio*, 13(1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02096-21>
59. Sorouri, M., Chang, T., Jesudhasan, P., Pinkham, C., Elde, N. C., & Hancks, D. C. (2020). Signatures of host–pathogen evolutionary conflict reveal MISTR—A conserved Mitochondrial Stress Response network. *PLoS Biology*, 18(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3001045>
60. Su, C.-I., Tseng, C.-H., Yu, C.-Y., & Lai, M. M. C. (2016). SUMO Modification Stabilizes Dengue Virus Nonstructural Protein 5 To Support Virus Replication. *Journal of Virology*, 90(9), 4308–4319. <https://doi.org/10.1128/jvi.00223-16>
61. Sun, B., Sundström, K. B., Chew, J. J., Bist, P., Gan, E. S., Tan, H. C., Goh, K. C., Chawla, T., Tang, C. K., & Ooi, E. E. (2017). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03932-1>
62. Tambyah, P. A., Ching, C. S., Sepramaniam, S., Ali, J. M., Armugam, A., & Jeyaseelan, K. (2016). microRNA expression in blood of dengue patients. *Annals of Clinical Biochemistry*, 53(4), 466–476. <https://doi.org/10.1177/0004563215604001>
63. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 341. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
64. Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., & Becker, I. (2014). *Dengue en México: análisis de dos décadas* ARTÍCULO ORIGINAL. 150, 122–129.

65. Varga, Z. T., Ramos, I., Hai, R., Schmolke, M., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., & Palese, P. (2011). The Influenza Virus Protein PB1-F2 Inhibits the Induction of Type I Interferon at the Level of the MAVS Adaptor Protein. *PLoS Pathogens*, 7(6), 1002067. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002067>
66. Vastag, L., Koyuncu, E., Grady, S. L., Shenk, T. E., & Rabinowitz, J. D. (2011). Divergent Effects of Human Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus-1 on Cellular Metabolism. *PLoS Pathogens*, 7(7), 1002124. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002124>
67. Wang, K., Jin, M., Liu, X., & Klionsky, D. J. (2013). Proteolytic processing of Atg32 by the mitochondrial i-AAA protease Yme1 regulates mitophagy. *Autophagy*, 9(11), 1828. <https://doi.org/10.4161/AUTO.26281>
68. Ward, A. M., Bidet, K., Yinglin, A., Ler, S. G., Hogue, K., Blackstock, W., Gunaratne, J., & Garcia-Blanco, M. A. (2011). Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures. *RNA Biology*, 8(6), 1173–1186. <https://doi.org/10.4161/rna.8.6.17836>
69. Waterhouse, A., Procter, J. B., Martin, D., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). JalView Version 2—A multiple sequence alignment editor and análisis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
70. Wong, R. R., Abd-Aziz, N., Affendi, S., & Poh, C. L. (2020). Role of microRNAs in antiviral responses to dengue infection. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 4. <https://doi.org/10.1186/S12929-019-0614-X>
71. World Health Organization. (2024, May 30). Disease Outbreak News; Dengue – Global Situation Available. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON518>.
72. Yu, C. Y., Liang, J. J., Li, J. K., Lee, Y. L., Chang, B. L., Su, C. I., Huang, W. J., Lai, M. M. C., & Lin, Y. L. (2015). Dengue Virus Impairs Mitochondrial Fusion by

Cleaving Mitofusins. *PLoS Pathogens*, 11(12), 1005350.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005350>

73. Zhou, D., Sun, M. H., Jiang, W. J., Li, X. H., Lee, S. H., Heo, G., Choi, J., Kim, K. S., & Cui, X. S. (2023). Knock-down of YME1L1 induces mitochondrial dysfunction during early porcine embryonic development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1147095. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2023.1147095/BIBTEX>

74. Zhu, L. J., & Altmann, S. W. (2005). mRNA and 18S–RNA coapplication–reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Analytical Biochemistry*, 345(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2005.07.028>

Anexo I.

Metodología de la identificación de posibles blancos putativos modulados por los miRNA en la infección por dengue.

Búsqueda de miRNAs diferencialmente expresados en la infección por dengue en suero de pacientes.

Con la finalidad de encontrar miRNAs que se expresan diferencialmente en la infección por dengue se realizó una búsqueda en la base de PubMed con las siguientes palabras claves “miRNAs y dengue”, “miRNAs y biomarcadores”, “identificación de miRNAs en dengue”. Asimismo se llevó a cabo la búsqueda de literatura relacionado con la expresión genética diferencial en células o pacientes infectados con dengue son los siguientes criterios de búsqueda “proteómica y dengue”, “transcriptómica y dengue”, “secuenciación de una sola célula y dengue”.

Red de interacción de miRNAs para la identificación de genes candidatos.

Los datos recopilados en la revisión de literatura descrita anteriormente se encontraron 31 miRNAs los cuales se construyó una red de interacción mediante el servidor web <https://www.mirnet.ca/>, estableciendo los parámetros de la siguiente tabla.

Tabla 1. Parámetros utilizados en el servidor web <https://www.mirnet.ca/>.

Organismo	H.sapiens
ID	ID de miRBase
Tejido	No especificado
Objetivos	Genes (miRTarBase v8.0)

Las proteínas encontradas en la red de interacción se buscaron entre las proteínas reportadas conteniendo bases de datos de proteómica o transcriptómica de fiebre por dengue y dengue grave. Las bases de datos se compararon contra el listado de proteínas que se predijeron *in silico* mediante la red de interacción de los miRNAs

modulados en la infección por dengue. Las proteínas que coincidieron en ambos grupos se utilizaron para llevar a cabo una clasificación según su expresión.

Finalmente, se buscó que las proteínas que son blancos potenciales de miRNAs tuvieran una regulación positiva en la infección por dengue, mientras que los miRNAs tuvieran una regulación negativa durante la infección, correlacionando los posibles blancos putativos.

Análisis de los procesos relacionados con los genes potencialmente modulados por los miRNAs.

El análisis por PANTHER Classification System es un sistema integral que combina la función génica, el análisis mediante ontología, vías de expresión, lo cual permite clasificar los genes de acuerdo con sus procesos.

Búsqueda de la función de los genes candidatos modulados por los miRNAs en la infección por dengue

Para facilitar la interpretación de la posible función de las proteínas candidatas se realizó una búsqueda en la literatura para conocer si se ha publicado una la función de estas en la infección por DENV, en el caso de no encontrar información en la infección con DENV la búsqueda pasaría a la identificación de estas proteínas en infecciones virales por flavivirus u otros virus o en su participación en alguna función de regulación del sistema inmune.