



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Perfil proteómico de las vesículas extracelulares liberadas por
células U937-DC-SIGN infectadas con dengue”**

T E S I S

Que presenta:

BIÓL. CARLOS ADRIÁN GONZÁLEZ MONTAÑO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directoras de la tesis:

Dra. Rosa Ma. del Ángel Núñez

Dra. Sofia Lizeth Alcaraz Estrada

Ciudad de México

Agosto, 2019

AGRADECIMIENTOS AL CONACYT

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo brindado durante la maestría y realización de este proyecto de tesis. También agradezco su apoyo durante mi estancia en Inglaterra realizada en Oxford Brookes University, ayudandome en mi formación de maestro en ciencias.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular en el CMN “20 de Noviembre” ISSSTE, bajo la dirección de la Dra. Sofia Lizeth Alcaraz Estrada.

A la Dra. Sofia Lizeth Alcaraz Estrada por recibirme en su laboratorio, ser una fuente de inspiración y guía. Por brindarme su confianza, apoyo y consejos durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Rosa Ma. del Ángel Núñez por recibirme en su laboratorio, por su apoyo, guía, sugerencias y consejos durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por su apoyo, guía, sugerencias y consejos durante la realización de este trabajo.

Al Dr. José Luis Rosales Encina por su apoyo, guía, sugerencias y consejos durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Víctor M. Bolaños García de la universidad Oxford Brookes por brindarme la oportunidad de realizar el análisis proteómico.

CONTENIDO

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	I
1.1. Flavivirus	1
1.1.1. Virus Dengue	1
1.1.2. Cuadro clínico	2
1.1.3. Epidemiología.....	3
1.1.4. Proteínas del virus	3
1.1.4.1. Proteínas estructurales.....	4
1.1.4.1.1. Proteína C	4
1.1.4.1.2. Glicoproteína de membrana prM	5
1.1.4.1.3. Glicoproteína de envoltura (E)	5
1.1.4.2. Proteínas no estructurales.....	6
1.1.4.2.1. NS1	6
1.1.4.2.2. NS2A y NS2B	6
1.1.4.2.3. NS3	7
1.1.4.2.4. NS4A y NS4B	7
1.1.4.2.5. NS5	7
1.1.5. Ciclo replicativo	8
1.2. Vesículas extracelulares	8
1.2.1. Exosomas.....	10
1.2.2. Biogénesis de los exosomas.....	10
1.2.3. Contenido de los exosomas	11
1.2.4. Exosomas median la comunicación célula-célula.....	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Exosomas y virus Dengue.....	15
2.2. Proteómica de vesículas extracelulares.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVO GENERAL	20
6. OBJETIVOS PARTICULARES	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1. Cultivo celular	21
7.2. Plaqueo del virus Dengue	21
7.3. Diferenciación de las células U937-DC-SIGN.....	22
7.4. Infección de células U937-DC-SIGN.....	22
7.5. Aislamiento de vesículas extracelulares.....	22
7.6. Gel SDS-PAGE.....	22
7.7. Proteómica de las vesículas extracelulares	23
7.8. Análisis de resultados de las proteínas de las vesículas extracelulares.....	24

7.9.	Validación del contenido proteico de las vesículas extracelulares	24
8.	RESULTADOS	26
8.1.	Gel SDS-PAGE de las proteínas de células y vesículas extracelulares provenientes de células infectadas y no infectadas	26
8.2.	Resultados obtenidos de la proteómica.....	27
8.3.	Proteínas del proteosoma	39
8.4.	Validación del análisis proteómico.....	41
8.4.1.	Cinética de PSMA1	41
8.4.2.	Cinética de PSMA4	43
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
10.	CONCLUSIONES	51
11.	PERSPECTIVAS	52
12.	BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

Actualmente se ha sugerido que las vesículas extracelulares representan un nuevo mecanismo de comunicación extracelular, transfiriendo proteínas, mRNAs, miRNAs y lípidos. Se ha demostrado que las proteínas y el RNA proveniente de vesículas extracelulares, juegan un papel importante en la patogénesis viral y el control de la respuesta inmune del huésped a la infección. Sin embargo, aún se desconoce el contenido proteico de estas vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV, así como también se desconoce su posible función durante la infección con dicho virus. Por ello, en este trabajo se analizaron las proteínas que conforman a dichas vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV y de células U937-DC-SIGN sin infectar. Entre las proteínas que pudimos identificar que se sobreexpresaron en las vesículas extracelulares de células infectadas, encontramos a once que constituyen al proteosoma (ATPasas [PSMC3 y PSMC6] no ATPasas [PSMD2] y proteínas del core [PSMA1, PSMA2, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMB2, PSMB4 y PSMB6]). Adicionalmente por western blot pudimos validar esta sobreexpresión de la proteína PSMA4. En conclusión, las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV, contienen subunidades confirmadas del proteosoma (PSMA1 y PSMA4) y también marcadores de exosomas como las tetrasparinas (CD9, CD63 y CD81) y la proteína HSP70.

ABSTRACT

It has been suggested that extracellular vesicles represent a new mechanism of extracellular communication, transferring proteins, mRNAs, miRNAs and lipids. It has been shown that proteins and RNA from extracellular vesicles play an important role in the viral pathogenesis and the control of the host immune response to infection. However, the protein content of extracellular vesicles derived from U937-DC-SIGN cells infected with DENV is still unknown, as well as its possible function during infection with the virus. Therefore, in this work we analyzed the proteins that are present in the extracellular vesicles derived from uninfected and DENV infected U937-DC-SIGN cells. Among the overexpressed proteins in the extracellular vesicles of infected cells, we found eleven that constitute the proteasome (ATPases [PSMC3 and PSMC6] not ATPases [PSMD2] and core proteins [PSMA1, PSMA2, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMB2, PSMB4 and PSMB6]). By western blot experiments we were able to confirm this over expression of the protein PSMA4. In conclusion, the extracellular vesicles derived from uninfected and DENV infected U937-DC-SIGN cells, contain proteasome subunits (PSMA1 and PSMA4) and also exosome markers such as tetrasparins (CD9, CD63 and CD81) and HSP70 protein.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Flavivirus

El género *Flavivirus* consta de más de 70 virus, muchos de los cuales son patógenos humanos transmitidos por artrópodos. Los *Flavivirus* causan una variedad de enfermedades, como fiebre, encefalitis y fiebres hemorrágicas. Los virus de mayor preocupación mundial incluyen al virus Dengue (DENV) responsable de la fiebre hemorrágica (DHF) y el síndrome de choque por Dengue (DSS), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV; Lindenbach *et al.*, 2007).

Los *Flavivirus* son partículas pequeñas (≈ 50 nm), esféricas que contienen un núcleo electrondenso de ≈ 30 nm, rodeado por una envoltura lipídica. Los virus sedimentan entre 170 y 210S y tienen densidades de flotación de 1.19 a 1.23 g/cm³, dependiendo de la composición lipídica, que puede variar según el huésped. Los genomas de los *Flavivirus* consisten en un único RNA de cadena positiva de ≈ 11 kb (sedimentación, 42S) con un 5' cap tipo I, m⁷GpppAmpN₂. También se ha detectado una metilación adicional del residuo N₂ (cap tipo II) en RNA de células infectadas. Los genomas codifican un solo marco de lectura abierto largo flanqueado por 5'- y 3'-regiones no codificantes (NCR) de ≈ 100 y 400-700 nucleótidos, respectivamente. El RNA genómico de los *Flavivirus* es infeccioso (Lindenbach & Rice, 2003).

1.1.1. Virus Dengue

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por el DENV transmitido por mosquitos. Existen cuatro serotipos del virus (DENV 1 a 4), que son miembros de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. El DENV es un virus envuelto de RNA de polaridad positiva monocatenario. El genoma de RNA consta de aproximadamente 10,700 nucleótidos y codifica una poliproteína precursora de 3,411 aminoácidos que contiene tres proteínas estructurales (cápside [C], membrana precursora [prM] y envoltura [E]) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A,

NS4B y NS5). Las proteínas estructurales son componentes de la partícula del virus maduro y no intervienen en la replicación del genoma viral (Alvarez *et al.*, 2006; Bäck & Lundkvist, 2013).

El marco de lectura abierto está flanqueado por dos regiones no traducidas (5' y 3'UTR) de aproximadamente 95-135 y 114-650 nucleótidos, respectivamente. El extremo 5' contiene un cap de tipo I, similar al de los mRNA celulares, y el RNA viral (vRNA) se traduce mediante un escaneo de iniciación dependiente de cap de la 5'-UTR. El extremo 3' carece de una cola de poli (A) pero termina en una estructura de tallo-burbuja (SL, del inglés stem loop) conservada. Tanto la 5'-UTR como la 3'-UTR se requieren para una traducción y replicación eficientes (Bäck & Lundkvist, 2013).

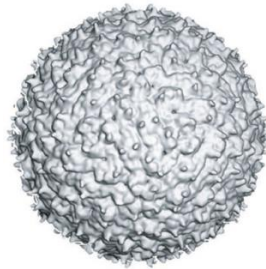


Figura 1 Estructura del virión de Dengue, virión maduro infeccioso (Perera & Kuhn, 2008).

Al igual que en otros *Flavivirus*, los viriones maduros de Dengue consisten en un genoma de RNA monocatenario rodeado por una nucleocápside icosaédrica o isométrica de aproximadamente 30 nm de diámetro. Esta nucleocápside está cubierta por una envoltura lipídica de aproximadamente 10 nm de profundidad. El virión completo tiene aproximadamente 50 nm de diámetro (Figura 1; Henchal & Putnak, 1990; Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.2. Cuadro clínico

El dengue es una enfermedad cuya sintomatología puede parecerse a un síndrome gripal que afecta a bebés, niños pequeños y adultos. Las

manifestaciones clínicas del dengue son fiebre elevada (40°C) que se acompaña de dolor de cabeza muy intenso, dolor detrás de los globos oculares, dolores musculares y articulares, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o salpullido. Los síntomas se presentan al cabo de un periodo de incubación de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado y por lo común duran entre 2 y 7 días (WHO, 2019).

El dengue grave es una complicación potencial mortal porque causa extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica. Los signos que advierten de esta complicación se presentan entre 3 y 7 días después de los primeros síntomas y se acompañan de un descenso de la temperatura corporal (menos de 38°C), dolor abdominal intenso, vómitos persistentes, respiración acelerada, hemorragias de las encías, fatiga, inquietud y presencia de sangre en vómito. Las siguientes 24 a 48 horas de la etapa crítica pueden ser letales (WHO, 2019).

1.1.3. Epidemiología

El DENV es el causante de la enfermedad conocida como dengue, transmitida por mosquitos de la especie *Aedes* y es la enfermedad causada por un arbovirus más importante, con un estimado de 10,000 muertes y 100 millones de infecciones sintomáticas por año en más de 125 países (Stanaway, J. D. et al 2017). Actualmente, aproximadamente la mitad de la población mundial (3.83 mil millones de personas) viven en áreas que son ambientalmente adecuadas para la transmisión del dengue. Adicionalmente se ha pronosticado que para el 2080 las personas en riesgo de la enfermedad subirá a 6.2 mil millones de personas, que representa el 60% de la población mundial (Messina *et al.*, 2019).

1.1.4. Proteínas del virus

La traducción del marco de lectura (ORF, del inglés Open Reading Frame) largo produce una poliproteína que es co- y post-traduccionalmente escindida en al

menos 10 proteínas (Figura 2). Esta poliproteína codifica las proteínas estructurales (C-prM-E) y no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Una peptidasa del huésped es responsable de las escisiones entre C/prM, prM/E, E/NS1 y 2K-NS4B. Una serin proteasa codificada por el virus (NS2B-NS3) es responsable de la escisión entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K Y NS4B/NS5. Se desconoce la enzima responsable de la escisión de NS1/NS2A (Lindenbach *et al.*, 2007).

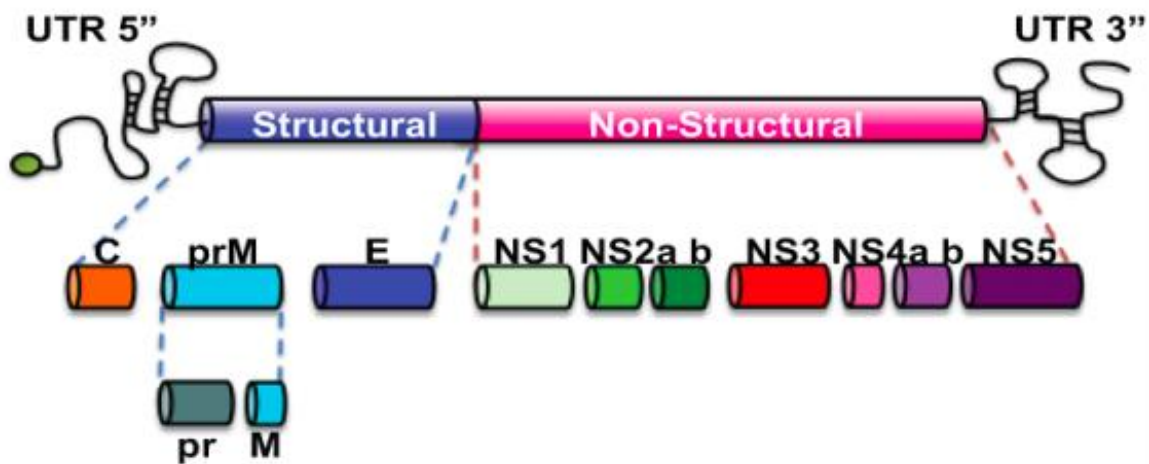


Figura 2 Genoma del virus Dengue es un RNA monocatenario de polaridad positiva con un único marco de lectura abierto. Codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales (Angel & Valle, 2013).

1.1.4.1. Proteínas estructurales

1.1.4.1.1. Proteína C

La proteína de la cápside (C) es altamente básica de ≈ 11 kd. Los residuos cargados se agrupan en los extremos N- y C-terminal, separados por una región hidrofóbica interna que media la asociación de la membrana (Ma *et al.*, 2004; Lindenbach *et al.*, 2007). Los viriones envueltos están compuestos por una bicapa lipídica con dos o más especies de glicoproteínas de la envoltura (E) que rodean a una nucleocápside, que consiste en un RNA monocatenario de sentido positivo con múltiples copias de una pequeña proteína de cápside (C) (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.4.1.2. Glicoproteína de membrana prM

El precursor de la glicoproteína de la proteína M, prM (≈ 26 kd), se transloca al ER por el C-terminal del dominio C. La región N-terminal de prM contiene uno a tres sitios de glicosilación unidos a N y seis residuos de cisteína conservados, los cuales están unidos por disulfuro. Una de las funciones principales de prM es evitar que la proteína E sufra un reordenamiento catalizado por ácido a la forma fusogénica durante el tránsito a través de la vía secretora. La conversión de partículas de virus inmaduros en viriones maduros se produce en la vía secretora y coincide con la escisión de prM en fragmentos pr y M por la proteasa furina residente en Golgi o una enzima relacionada. Después de la escisión, los heterodímeros prM-E se disocian, se libera el fragmento pr y se forman los homodímeros E. El bloqueo de la escisión de prM por tratamiento con cloruro de amonio o por mutación del sitio de escisión similar a la furina conduce a la liberación de viriones inmaduros no infecciosos (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.4.1.3. Glicoproteína de envoltura (E)

La proteína E (≈ 53 kd), o proteína de la superficie de los viriones de *Flavivirus*, media la unión al receptor y la fusión de la membrana. Cada subunidad de proteína E se compone de tres dominios: I, que forma un barril β ; II, que se proyecta a lo largo de la superficie del virus entre las regiones transmembrana de las subunidades homodímeras; y III, que mantiene un pliegue inmunoglobulin-like. El péptido putativo de fusión, que media la inserción en la membrana de la célula blanco, se localiza en el dominio II, distal a la región transmembrana. El dominio III parece estar involucrado en la unión del receptor y es un blanco principal de anticuerpos neutralizantes (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.4.2. Proteínas no estructurales

1.1.4.2.1. NS1

La glicoproteína NS1 (≈ 46 kd) se traslada al ER durante la síntesis y clivaje de la proteína E por la peptidasa señal del huésped, mientras que una enzima desconocida residente del ER del huésped corta la unión NS1/NS2A. NS1 contiene dos o tres sitios de glicosilación vinculados a N y 12 cisteínas conservadas que forman enlaces disulfuro. NS1 tiene un papel importante pero poco claro en la replicación de RNA. NS1 se localiza en sitios de replicación de RNA, y la mutación de los sitios de glicosilación vinculados a N en NS1 puede conducir a defectos dramáticos en la replicación del RNA y la producción de virus. La función de las formas extracelulares de NS1 aún no está clara. Durante la infección, se producen fuertes respuestas humorales contra esta proteína y los anticuerpos contra la forma de la superficie celular pueden dirigir la lisis mediada por el complemento de las células infectadas por virus. La forma secretada de NS1 se caracterizó originalmente como el antígeno soluble de fijación del complemento presente en el suero y los tejidos de los animales infectados, que alcanza su punto máximo durante la fase aguda de la infección (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.4.2.2. NS2A y NS2B

NS2A es una proteína hidrófoba relativamente pequeña (≈ 22 kd). Su extremo N-terminal es generado a través del clivaje de NS1-NS2A por una enzima desconocida del huésped residente en el ER. La escisión citosólica en la unión NS2A/NS2B es mediada por la serina proteasa NS2B-NS3. NS2B es también una pequeña proteína asociada a la membrana (≈ 14 kd). NS2B forma un complejo estable con NS3 y actúa como un cofactor para la serina proteasa NS2B-NS3 (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.4.2.3. NS3

La proteína NS3 es multifuncional grande (≈ 70 kd), que contiene varias actividades requeridas para el procesamiento de poliproteínas y la replicación del RNA (Lindenbach *et al.*, 2007). El extremo C-terminal de la proteína NS3 tiene tres propiedades enzimáticas: una 5' RNA-trifosfatasa (RTP), nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y helicasa. NS3 forma un complejo con NS5 y ayuda en la replicación viral mediante el desenrollamiento del RNA y la desfosforilación antes del extremo 5' del capping (Bäck & Lundkvist, 2013).

1.1.4.2.4. NS4A y NS4B

Las proteínas NS4A y NS4B son hidrofóbicas pequeñas (16 kd y 27 kd, respectivamente). El posible rol de la proteína NS4A en la replicación del RNA se sustenta en el hecho de que se localiza en complejos de replicación. La NS4B colocaliza con NS3 y con el RNA viral de doble cadena (dsRNA) (esta asociación se ha vinculado con su actividad de helicasa) en estructuras de membrana derivadas del ER que se supone son sitios de replicación del RNA (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.4.2.5. NS5

La proteína NS5 es una multifuncional grande (103 kd), altamente conservada y tiene tres dominios funcionales principales: la N-terminal S-adenosil metionina metiltransferasa (MTasa) y de guanilil transferasa, las secuencias de localización nuclear (NLS) y la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) en su dominio C-terminal (Egloff *et al.*, 2002; Lindenbach *et al.*, 2007). La MTasa abarca los residuos de aminoácidos del 1 al 239 y es responsable de las metilaciones de la guanina N-7 y la ribosa 2'-O necesarias para la adición del cap del genoma del DENV y la generación de un cap tipo II. La estructura del cap es reconocida por la maquinaria de traducción de la célula huésped. Las NLS (residuos 320-405) interactúan con la helicasa viral NS3 y es reconocido por

factores celulares, lo que permite el transporte de proteínas al núcleo. El dominio de polimerasa NS5 RdRp (residuos 273-900) es responsable de sintetizar nuevos genomas del RNA viral (vRNA) (Bäck & Lundkvist, 2013).

1.1.5. Ciclo replicativo

Los diferentes pasos del ciclo replicativo de *Flavivirus* son los siguientes: 1.- Adhesión. La interacción inicial de la proteína E con la célula huésped esta medida por dos moléculas: heparán sulfato en células epiteliales (células vero) y por la lectina DC-SIGN para las células dendríticas; ambas moléculas permiten que el virus se concentre en la superficie celular y por lo tanto facilitan su unión al complejo receptor. 2.- La unión de los viriones a receptores que desencadena la endocitosis mediada por receptor. 3.- Debido al bajo pH del endosoma, las glicoproteína E media la fusión de la membrana viral y celular permitiendo la liberación de la nucleocápside y del RNA viral (vRNA) en el citoplasma. 3.- El vRNA se traduce en una poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares generando proteínas individuales y funcionales. 4.- Las proteínas virales NS replican el genoma de RNA. 5.- La morfogénesis viral ocurre en la membrana del retículo endoplásmico (ER), donde la proteína C y el vRNA geman en las membranas del ER en donde están las proteínas M y E formando las partículas virales inmaduras. 6.- Las partículas virales inmaduras son transportadas a través de la vía secretora y en el ambiente ácido de la red trans-Golgi (TGN) la escisión mediada por furina de prM conduce a la maduración del virus. 7.- El virus maduro se libera de la célula (Bäck & Lundkvist, 2013).

1.2. Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares se definen ampliamente como vesículas rodeadas por membrana liberadas por las células. Estas vesículas tienen diferentes orígenes y composición. Basados en su biogénesis, se dividen en tres categorías principales: cuerpos apoptóticos, exosomas y microvesículas. Los tres tipos de vesículas están encerradas por una bicapa lipídica, pero varían en tamaño (de 30

a 2000 nm de diámetro; Tabla 1), así como en la composición. En contraste con las microvesículas, que se generan por la gemación de la membrana plasmática, los exosomas se derivan de la vía endosomal y tienen una composición única de lípidos y proteínas (Schorey *et al.*, 2015).

Tabla 1 Vesículas extracelulares (Mathivanan *et al.*, 2010A).

	Exosomas	SMVs (Shedding microvesicles).	ABs
Tamaño (diámetro)	30-100 nm	100-1000 nm	50-500 nm
Morfología	En forma de copa	Varias formas	Heterogéneo
Composición lipídica	ácido lisobisfosfatídico, baja exposición a fosfatidilserina, colesterol, ceramida, balsas lipídicas y esfingomielina	Alta exposición a fosfatidilserina y colesterol	Alta exposición a fosfatidilserina
Marcadores	Alix, TSG101, HSP70, CD63, CD81 y CD9	Selectinas, integrinas, CD40 y metaloproteinasas	Histonas
Sitio de origen	MVBs	Membrana plasmática	----
Modo de liberación extracelular	Constitutivo y regulado	Regulado	Regulado
Mecanismo de descarga	Exocitosis de MVBs	Budding de la membrana plasmática	Contracción celular y muerte
Composición	Proteínas, miRNA y mRNA	Proteínas, miRNA y mRNA	Proteínas, DNA, miRNA y mRNA

1.2.1. Exosomas

En los últimos años, se ha descubierto que los exosomas son una herramienta importante para la comunicación intercelular mediante la transferencia de proteínas, lípidos y RNAs (Chahar *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Son vesículas con una bicapa lipídica de tamaño nanométrico (30-100 nm), con una densidad de 1.13-1.19 g/ml, secretados por prácticamente todos los tipos celulares, y formados durante la maduración de endosomas tras la invaginación y brotación de la membrana limitante de los endosomas tardíos como vesículas intraluminales (ILVs) de cuerpos multivesiculares (MVBs). Los exosomas son liberados por casi todos los tipos celulares y también se han confirmado en todos los líquidos corporales, como en sangre, orina, saliva, leche materna, lavado bronquial, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico.

1.2.2. Biogénesis de los exosomas

La biogénesis exosómica comienza con la endocitosis y la formación de endosomas tempranos. El endosoma temprano madura a un endosoma tardío, que se caracteriza por la formación de vesículas intraluminales (ILV) dentro del lumen del endosoma. Las ILV de 30-100 nm de diámetro, formadas por brotes internos de la membrana endosomal, envuelven al azar porciones del citosol e incorporan proteínas transmembranales y periféricas en la membrana invaginante. Esto conduce a la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs). Aunque la endocitosis y el tráfico de receptores de membrana plasmática en MVBs son responsables de su degradación tras la fusión con lisosomas, el destino de los MVBs puede variar y no todos los MVBs se degradan en los lisosomas. Un grupo de MVBs son capaces de fusionarse con la membrana plasmática para la generación de exosomas (Figura 3; Chahar *et al.*, 2015).

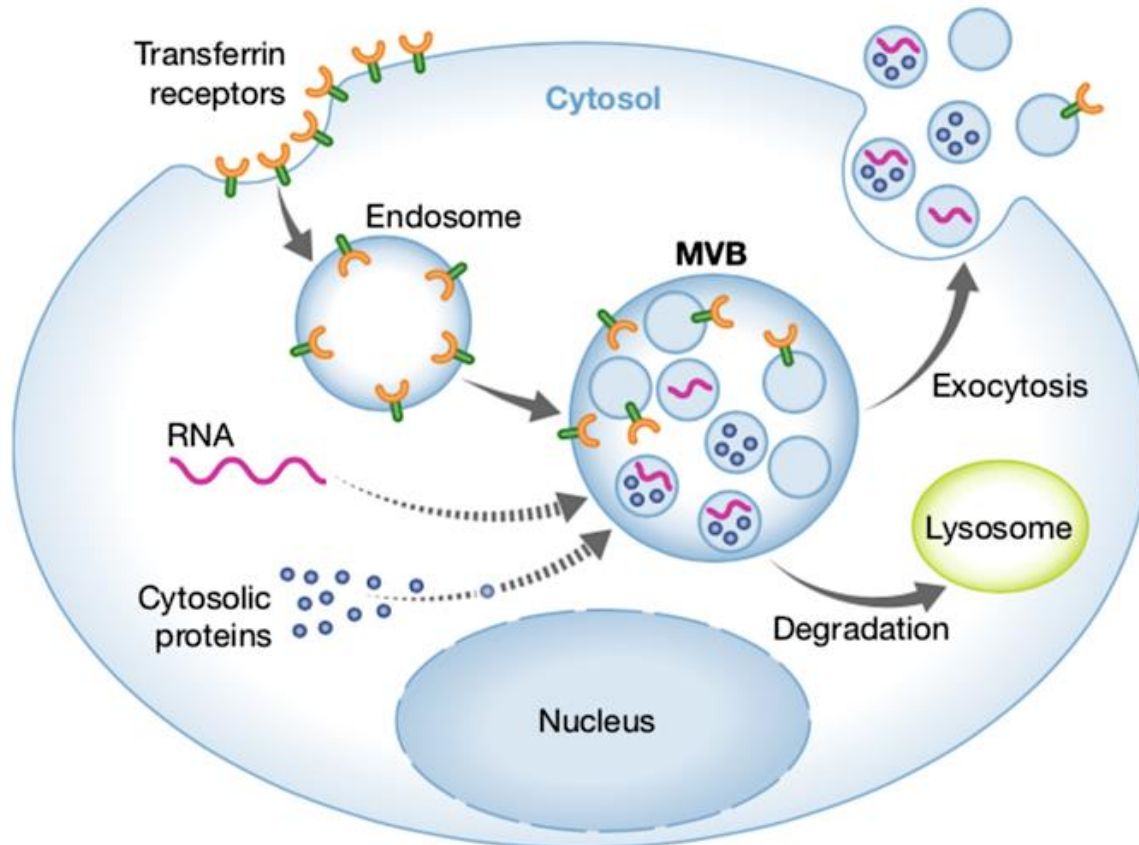


Figura 3 Biogénesis de los exosomas. La formación de los exosomas inicia con la endocitosis y la formación de endosomas tempranos. El endosoma temprano madura a un endosoma tardío y posteriormente da origen a los MVB. Los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos se transportan a MVB, sobre o dentro de las vesículas intraluminales. La liberación de los exosomas se da tras la fusión del MVB con la membrana plasmática o pueden fusionarse con los lisosomas para su degradación (Schorey et al., 2015).

1.2.3. Contenido de los exosomas

Los exosomas contienen un grupo distinto de proteínas tales como: Alix, TSG101, HSP70 y las tetrasparinas CD63, CD81 y CD9 (Mathivanan *et al.*, 2010A). Una clase de proteínas citosólicas comúnmente observadas en los exosomas incluye a las Rabs, la familia más grande de GTPasas pequeñas, que regulan el acoplamiento de exosomas y la fusión de membranas (Mears *et al.*, 2004). Además de Rabs, los exosomas son ricos en anexinas (anexinas I, II, IV, V, VI, VII y X1) que ayudan en el tráfico de membranas y eventos de fusión (Figura 4; Futter & White, 2007; Mathivanan *et al.*, 2010A).

Otras proteínas exosómicas incluyen a las enzimas metabólicas GAPDH, enolasa 1, aldolasa 1, PKM2, PGK1, PDIA3, GSTP1, DPP4, AHCY, TPL1,

peroxirredoxinas, P4HB, LDH, ciclofilina A, FASN, MDH1 Y CNP, proteínas ribosomales (RPS3), transmembrana (PIGR, LAMP1 Y CD59), transducción de señal (sintenina, 14-3-3, proteínas G, ARF1, CDC42, estomatina, SLC9A3R1, RALA, PDCD6, rack1, mucina 1, EHD1, RAN, PEBP1, MIF, RRAS2, RAC1, NRAS y EHD4), adhesión (MFGE8 e integrinas), ATPasas (VCP, ATP1A1, DYNC1H1, ATP5B y ACLY), proteínas del citoesqueleto (actinas, tubulinas, cofilina 1, ezrina, profilina 1, moesina, radixina, miosina, perlecan, THBS1, IQGAP1, queratinas, gelsolina, fibronectina 1 y LGALS3BP) y moléculas de ubiquitina (ubiquitina B y C; Mathivanan *et al.*, 2010B; Mathivanan *et al.* 2010A).

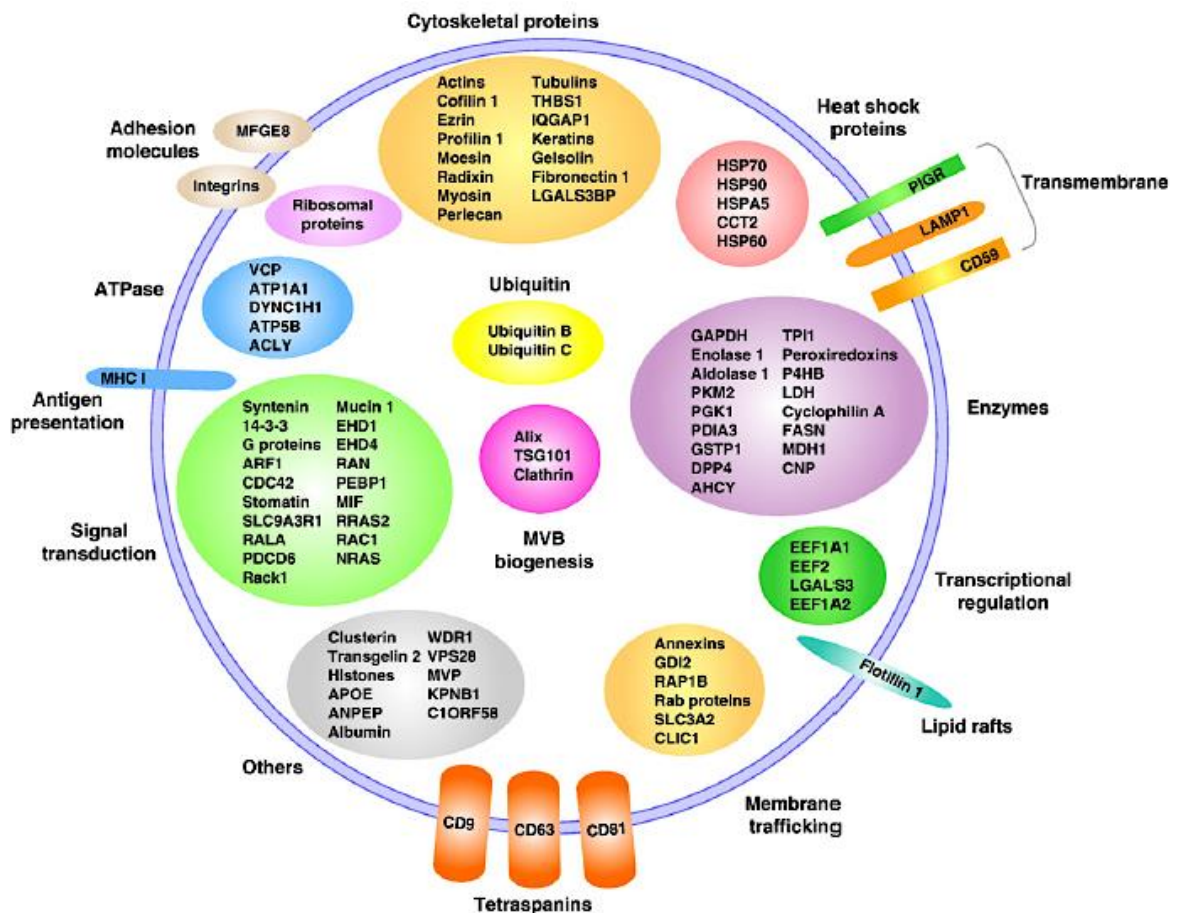


Figura 4 Contenido de los exosomas (Mathivanan *et al.*, 2010A).

1.2.4. Exosomas median la comunicación célula-célula

Una de las funciones más importantes de los exosomas es la comunicación intercelular. Se han sugerido tres posibles mecanismos de comunicación mediada por exosomas: A) Las proteínas de membrana exosomal pueden interactuar con receptores en una célula blanco y activar la señalización intracelular (modo juxtacrino). B) Las proteínas de membrana exosomal pueden escindirse por proteasas en el espacio extracelular. Los fragmentos cortados pueden actuar entonces como un ligando soluble que se une al receptor blanco de la superficie celular. Este mecanismo a su vez activa la cascada de señalización dentro de la célula blanco. C) Los exosomas pueden fusionarse con la membrana celular blanco y liberar su contenido dentro de la célula receptora de una manera no selectiva. La membrana superficial de las células blanco a su vez puede modificarse mediante la adición de nuevos receptores de membrana (de membranas exosómicas) y diferentes composiciones lipídicas. Las moléculas exosómicas (proteína, mRNA y miRNA) pueden activar una multitud de eventos de señalización en la célula receptora (Figura 5; Mathivanan *et al.* 2010A).

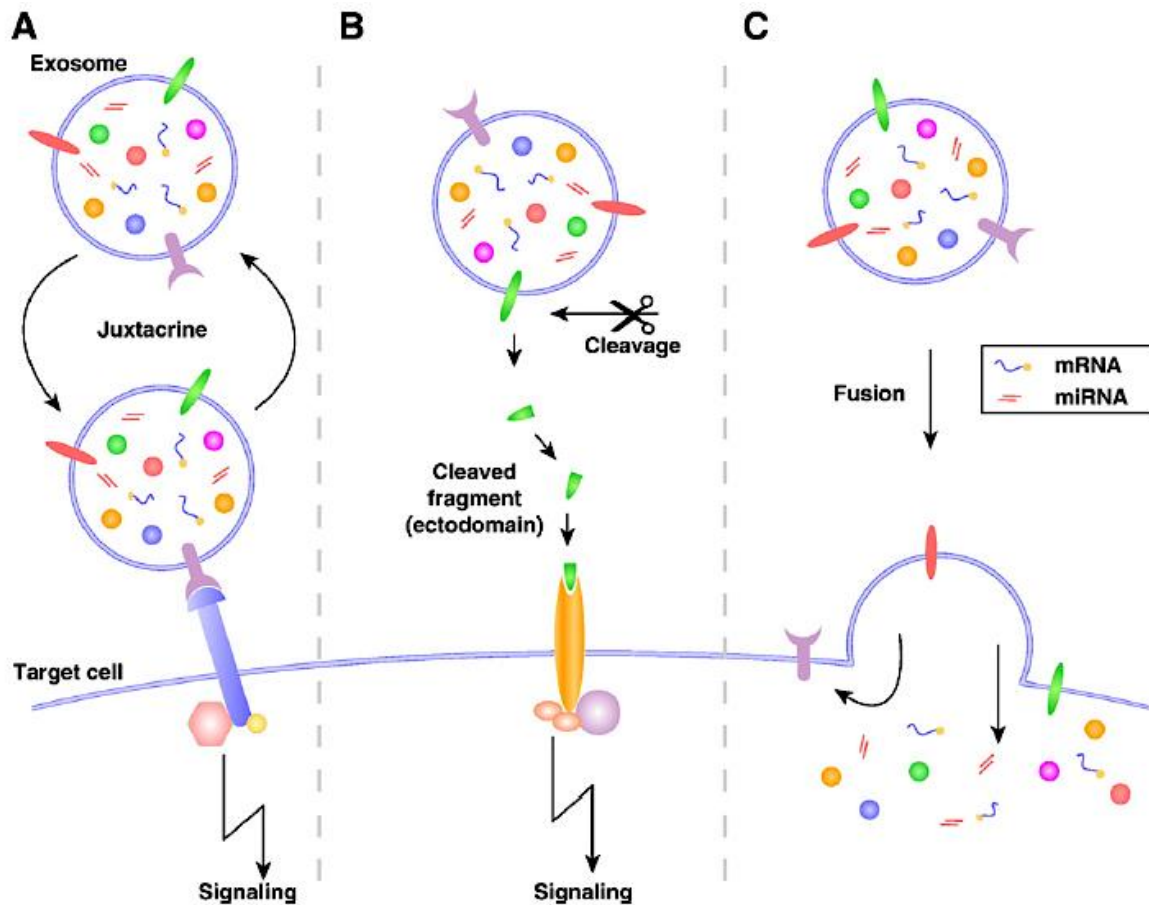


Figura 5 Posibles mecanismos de comunicación intercelular mediada por exosomas. A) Las proteínas de membrana del exosoma pueden interactuar con los receptores de la célula blanco. B) Las proteínas de membrana del exosoma pueden escindirse por proteasas, los fragmentos pueden actuar como un ligando que se puede unir al receptor de superficie de una célula blanco y activar una cascada de señalización. C) Los exosomas pueden fusionarse con la membrana de la célula blanco y liberar su contenido dentro de la célula. (Mathivanan et al., 2010A).

2. ANTECEDENTES

La caracterización de las proteínas cargo exosómicas es de gran interés porque esta puede proporcionar información sobre la biogénesis del exosoma, el estado celular y lo que la célula va a comunicar, pero también puede ser una fuente de biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad, pronosis y la respuesta al tratamiento (Schey et al., 2015).

2.1. Exosomas y virus Dengue

En un estudio realizado por Reyes-Ruiz y colaboradores en el 2019 se sugiere que durante la infección por DENV en células del mosquito *Aedes albopictus*, se produce una población heterogénea de vesículas (50 a 150 nm), que son positivas a CD9 (una tetrasparina) y también observaron que los exosomas liberados de las células C6/36 infectadas con DENV son más grandes en comparación con el Mock.

En el 2018 Martins y colaboradores realizaron un estudio donde compararon el contenido molecular de las EVs que son secretadas por células dendríticas primarias humanas en diferentes condiciones: no infectadas o infectadas con cepas de DENV3 aisladas de pacientes con diferentes fenotipos de infección (un caso grave que involucra al síndrome de shock por dengue (DSS) y un caso leve). Estos autores observaron la presencia de EVs con la forma de copa que se confirmó mediante microscopía electrónica e inmunotinción con CD9, CD81 y CD83. El contenido de RNA de las EVs de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (mdDCs) infectadas contenían varios mRNAs y miRNAs relacionados con la respuesta inmune en comparación con las EVs de mdDCs infectados de forma simulada. Estos resultados sugieren que la modulación inmune diferencial de mdDCs por DENV puede lograrse a través de la vía EV. Además, observaron una asociación de EVs con partículas infecciosas de DENV que parecen estar protegidas de los anticuerpos dirigidos a la proteína de la envoltura del DENV.

En otro estudio realizado por Zhu y colaboradores en el 2015, observaron en modelos celulares (THP-1, A549, Huh7, 293T, U937, HepG2, HeLa y BHK-21) de infección por DENV2, que la proteína transmembrana inducible por interferón 3 (IFITM3) contribuyó a la inhibición inducida por interferón de la entrada del DENV. Por primera vez se demostró la presencia en exosomas de IFITM en el entorno extracelular, y la identificación de la capacidad del exosoma celular para administrar IFITM3 de manera intercelular y así transmitir su efecto antiviral de células infectadas a no infectadas.

2.2. Proteómica de vesículas extracelulares

Haraszti y colaboradores en el 2016 realizaron un estudio sobre el análisis lipidómico de alta resolución y proteómico de exosomas y MVs derivadas por ultracentrifugación diferencial de 3 diferentes tipos celulares: células de glioblastoma U87, células de carcinoma hepatocelular Huh7 y células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea humana (MSCs). Identificaron 3,532 proteínas y 1,961 especies de lípidos. Los proteomas de los exosomas U87 y Huh7 fueron similares entre sí, pero diferentes de los proteomas de los exosomas de MSC, mientras que los lipidomas de los exosomas Huh7 y MSC fueron similares entre sí, pero diferentes de los lípidos de los exosomas U87. Además, los exosomas exhibieron proteínas de matriz extracelular, enlaces de heparina, receptores, respuesta inmune y funciones de adhesión celular, mientras que los MVs se enriquecieron en el retículo endoplásmico, con el proteasoma y las proteínas mitocondriales.

Jia y colaboradores en el 2017 compararon directamente los cambios en el contenido de proteínas de exosomas secretados por células HepAD38 con o sin replicación de HBV. HepAD38 es una línea celular de hepatoblastoma transfectada de forma estable que replica el HBV humano bajo control de un promotor regulado por tetraciclina. Los exosomas se aislaron a partir de sobrenadantes de células HepAD38 cultivadas con o sin doxiciclina (dox) y su pureza se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y ensayos de Western immunoblotting. Utilizaron espectrometría de masas LC-MS/MS basada en la intensidad de iones para analizar el contenido proteico de los exosomas de las células replicantes del HBV [HepAD38 (dox⁻)-exo] y de las células no replicantes de HBV [HepAD38 (dox⁺)-exo]. Se identificaron 1,412 grupos de proteínas exosomales, entre los cuales la abundancia de 35 proteínas cambió significativamente en las células con replicación del virus de la hepatitis B (HBV). Este estudio demuestra que el nivel de algunas proteínas celulares presentes en los exosomas secretados por las células HepAd38 podrían modularse mediante la replicación del HBV. Descubrieron que las proteínas de la subunidad del proteosoma (PSMC1, PSMC2, PSMD1 y PSMD7) se cargaban de

manera diferente en exosomas de células HepAD38 que replicaban a HBV y podían modular la producción de moléculas proinflamatorias (IL-6) en los monocitos receptores. Con base en los resultados de los investigadores ellos sugieren que los exosomas modificados debido a la presencia de HBV podrían transmitir señales a las células inmunes y pueden mediar la comunicación transcelular y las regulaciones inmunes. Sugiriendo que este mecanismo puede permitir el mantener una infección persistente en el hígado.

Jeannin y colaboradores en el 2018 describieron la alteración en el contenido proteico de las EVs de plasma tras la infección con el retrovirus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-1). HTLV-1 es el agente etiológico de una enfermedad linfoproliferativa (ATL) y una serie de enfermedades inflamatorias, incluida una enfermedad inflamatoria neurodegenerativa (HAM/TSP). Encontraron que las EVs de plasma son más abundantes y más pequeñas en los portadores asintomáticos de HTLV-1 o en los pacientes con HAM/TSP en comparación con los donantes sanos no infectados.

El virus Langat, Flavivirus transmitido por garrapatas (LGTV), es un modelo estrechamente relacionado con el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), y utiliza profusamente exosomas de artrópodos para la transmisión de RNA vírico y proteínas a los queratinocitos de piel humana y células endoteliales sanguíneas. La detección de la proteína NS1 en artrópodos y exosomas neuronales sugirió que los exosomas contienen proteínas virales. El tratamiento con GW4869, un inhibidor selectivo que bloquea la liberación de exosomas, afectó las cargas de LGTV tanto en exosomas derivados de artrópodos como en exosomas derivados de células de mamíferos. Actualmente, GW4869, un inhibidor neutro de la esfingomielinasa, es el agente farmacológico más utilizado para bloquear la generación de exosomas. GW4869 inhibe la gemación interna mediada por ceramida de MVBs y la liberación de exosomas maduros de los MVBs (Essandoh *et al.*, 2015). Los ensayos de migración de Transwell mostraron que los exosomas derivados de células endoteliales microvasculares infectadas del cerebro (que constituyen la barrera hematoencefálica) facilitaron la transmisión del RNA de LGTV y proteína. Se sugiere que los *Flavivirus* usan exosomas derivados

de artrópodos como un medio para la transmisión de RNA y proteínas virales del vector, y los exosomas de vertebrados para la diseminación dentro del huésped que posteriormente puede permitir la neuroinvasión y la neuropatogénesis (Zhou *et al.*, 2018).

Con base en lo mencionado anteriormente, sabemos que existe una liberación de exosomas en condiciones de infección por DENV con contenido específico y pueden modular la respuesta inmune; sin embargo, hasta el momento se desconoce el perfil proteico, por lo que es de nuestro interés identificar las proteínas presentes en los exosomas derivados de células infectadas. Este trabajo contribuye a una línea de investigación de un área que aún no se había explorado.

3. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha sugerido que los exosomas representan un nuevo mecanismo de comunicación intercelular, transfiriendo proteínas, lípidos y RNAs (Meckes y Raab-Traub, 2011; Chahar *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las proteínas y el RNA provenientes de exosomas, juegan un papel importante en la patogénesis viral y en el control de la respuesta inmune del huésped a la infección (Pegtel *et al.*, 2010; Chahar *et al.*, 2015). Sin embargo, aún se desconoce el contenido proteico de estas vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV2, así como también se desconoce su posible función durante la infección. Por ello en el presente trabajo se identificarán y analizarán las proteínas que conforman a los exosomas derivados de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV2 y células U937-DC-SIGN sin infectar.

4. HIPÓTESIS

El contenido proteico de las vesículas extracelulares de células U937 DC SIGN infectadas con DENV es diferente del contenido de las vesículas de células no infectadas.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar el contenido proteómico de las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas y no infectadas con el virus Dengue.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar vesículas extracelulares derivadas de las células U937-DC-SIGN infectadas o no infectadas con el virus Dengue.
- Analizar el contenido proteico de las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas o no infectadas.
- Confirmar la presencia de algunas de las proteínas identificadas en las vesículas extracelulares derivadas de las células U937-DC-SIGN infectadas y no infectadas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo celular

Las células U937-DC-SIGN crecieron en medio RPMI completo a una temperatura de 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. El medio de cultivo RPMI completo se preparó con medio RPMI Advance, SFB al 6%, penicilina 2x y glutamina 2x.

Para preparar el medio de diferenciación se utilizó medio RPMI Advance con penicilina 2x, glutamina 2x y SFB al 6% sin exosomas. Para eliminar los exosomas del SFB, éste se ultracentrifugó a 110, 000 xg por 2 horas a 4°C, se descartó la pastilla y el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0.22 µm para eliminar toda partículas de tamaño mayor a 220 nm.

7.2. Plaqueo del virus Dengue

Para realizar el ensayo de formación de placa lítica o plaqueo se utilizó una multiplaca de 24 pozos en donde se sembraron 100 000 células (BHK 21) por pozo. Las células se utilizaron cuando ya estaban confluentes.

Se realizaron las diluciones en base 10, para el primer tubo se utilizó 450 µl de medio Hanks y 50 µl de DENV. Posteriormente, para el tubo dos se tomaron 50 µl del tubo uno y se le añadió 450 µl de medio Hanks. Se repitieron estos pasos hasta tener la dilución deseada.

Después de tener las diluciones se procedió a retirar el medio a cada pozo de la multiplaca y se colocó 200 µl de la dilución correspondiente a cada pozo, se dejó por dos horas en la incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, se añadió 1 ml de carboximetilcelulosa a cada pozo y se dejó por 5 días en la incubadora para después revelar el plaqueo.

Para preparar la carboximetilcelulosa se añadió SFB al 3%, glutamina al 1x, penicilina al 1x y medio DMEM para dejar a una concentración de 0.8% la carboximetilcelulosa.

7.3. Diferenciación de las células U937-DC-SIGN

Se diferenciaron 10^6 células U937-DC-SIGN en un frasco de cultivo de 25 cm² con medio de diferenciación con 1:10,000 de PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato) y medio RPMI completo durante 48 horas.

7.4. Infección de células U937-DC-SIGN

La infección de las células U937-DC-SGN previamente diferenciadas con PMA, se realizó a una multiplicidad de infección de 1 con DENV2. También se realizó una infección simulada (Mock), para ello, a las células U937-DC-SIGN previamente diferenciadas con PMA se les adicionó medio RPMI en lugar de utilizar el virus.

7.5. Aislamiento de vesículas extracelulares

Se colectó el sobrenadante de las células U937-DC-SIGN infectadas con DENV2 y el de las células de la simulación de la infección de acuerdo al tiempo a evaluar.

El sobrenadante de las células infectadas y no infectadas se centrifugó a 500 xg por 5 minutos, posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 2000 xg por 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 20 000 xg por 60 minutos y se filtró el sobrenadante utilizando un filtro de 0.22 μ m. Posterior a la filtración, se le añadió el reactivo de aislamiento de exosomas 0.5:1 y se dejó toda la noche a 4°C. Por último, se centrifugó a 10 000 xg por 60 minutos y la pastilla se resuspendió en 30 μ l de PBS 1x.

7.6. Gel SDS-PAGE

Las proteínas presentes en los exosomas de células infectadas y no infectadas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. Dichos geles se realizaron para saber la integridad de las proteínas presentes en las muestras.

7.7. Proteómica de las vesículas extracelulares

Se utilizó un SDS Precast Gels NXG42012 4-20% 12 well 10x10 cm (Expedeon) para analizar la muestra de exosomas derivados de células U937-DC-SIGN infectadas y no infectadas. El gel fue teñido con Coomassie brilliant blue. Se cortó el gel con un bisturí primero separando los carriles de las vesículas infectadas y la condición Mock. Posteriormente se cortaron aproximadamente en pedazos de 1x2 mm³ y se colocaron en tubos de 1.5 ml. Se añadió 600 µl de la solución de lavado, se dejó toda la noche a temperatura ambiente en agitación.

Al día siguiente se removió la solución de lavado y se añadieron 600 µl de la solución de lavado. Se dejó por 2 o 3 horas, posteriormente se centrifugó para remover la solución de lavado. Después se adicionaron 600 µl de acetonitrilo, se deshidrataron los pedazos de gel por 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió el acetonitrilo de la muestra y se repitió este paso. Se añadieron 100 µl de buffer 10 mM DTT por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se removió la solución. Se adicionó 100 µl del buffer 50 mM de iodoacetamida a temperatura ambiente por 30 minutos, se removió la solución. Se añadió 600 µl de acetonitrilo por 5 minutos a temperatura ambiente. Las piezas del gel deben quedar blancas. Se remueve la solución.

Se rehidrataron las piezas de gel en 200 µl de 100 mM de bicarbonato de amonio por 10 minutos a temperatura ambiente. Se quitó la solución y después se adicionó 600 µl de acetonitrilo. Se deshidrataron los pedazos de gel por 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró la solución. Se añadieron 200 µl de la solución 1:10 de tripsina en 50 mM de bicarbonato de amonio. Se rehidrataron las muestras en hielo durante 10 minutos (sin exceder el tiempo) con agitación ocasional. Se centrifugaron las muestras y se removió el exceso de la solución de tripsina. Después se añadió 5 µl de 50 mM de bicarbonato de amonio a las muestras y se dejó la digestión overnight a 37°C.

Posteriormente, se añadieron 50 μ l de 50 mM de bicarbonato de amonio a los tubos que contienen los pedazos de gel. Se incubó por 10 minutos en agitación y se colectó el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml. Se añadió 50 μ l de buffer de extracción 1 al tubo que contiene los pedazos de gel. Se incubó por 10 minutos en agitación y se colectó el sobrenadante en el tubo de 1.5 ml. Se volvió a adicionar 50 μ l del buffer 2 al tubo que contiene los pedazos de gel. Se incubó por 10 minutos en agitación y nuevamente se colectó el sobrenadante.

Las muestras se centrifugaron en una centrifuga de vacío (mi Vac Duo Concentrator) y la pastilla se resuspende en 20 μ l de buffer A. La espectrometría LC-MS/MS se realizó utilizando el Thermó Q exactive (Target Discovery Institute, University of Oxford).

7.8. Análisis de resultados de las proteínas de las vesículas extracelulares

Las vías funcionales de las proteínas identificadas se asignaron utilizando el software The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID 6.7; <https://david-d.ncifcrf.gov/>). El análisis de enriquecimiento de vías KEGG fue realizado utilizando DAVID 6.7. La red de interacción proteína-proteína fue generada utilizando STRING 11.0 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>).

7.9. Validación del contenido proteico de las vesículas extracelulares

Las células U937-DC-SIGN diferenciadas se infectaron o no a una MOI de 1 con DENV2 y se colectó el sobrenadante a 0, 6, 12, 24 y 48 horas post-infección. Se analizó el perfil proteico de las vesículas extracelulares obtenidas de los sobrenadantes obtenidos durante la infección con DENV.

Los extractos proteicos de las vesículas extracelulares se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semihúmeda a 16 volts por 50 minutos. Posteriormente, la membrana se tiñó con colorante de Ponceau y se bloqueó con TBS 1x con 10% de leche durante 1 hora. Se incubó con anticuerpos anti PSMA4 y con anti PSMA1

a una dilución de 1:500 y con anti CD9, anti CD63, antiCD81 y anti-HSP70 a una dilución de 1:500. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario. Las proteínas fueron reveladas utilizando el kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate y utilizando el software Image Studio.

8. RESULTADOS

8.1. Gel SDS-PAGE de las proteínas de células y vesículas extracelulares provenientes de células infectadas y no infectadas

Primeramente, las células U937-DC-SIGN diferenciadas fueron infectadas o no con DENV2 y tanto las células como los sobrenadantes fueron colectados a las 12 horas post-infección. A este tiempo, se tiene ya replicación viral sin que exista salida de viriones de las células infectadas. Los extractos proteicos totales tanto de las células como de los exosomas aislados de ambas condiciones fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE al 10% para conocer la integridad de las proteínas de dichas muestras. El gel se tiñó con Coomassie brilliant blue (Figura 6 y 7). Lo primero que pudimos observar fue que las proteínas provenientes de ambos extractos estaban integras y como era de esperarse, la abundancia de las proteínas presentes en los exosomas es menor que las proteínas celulares.

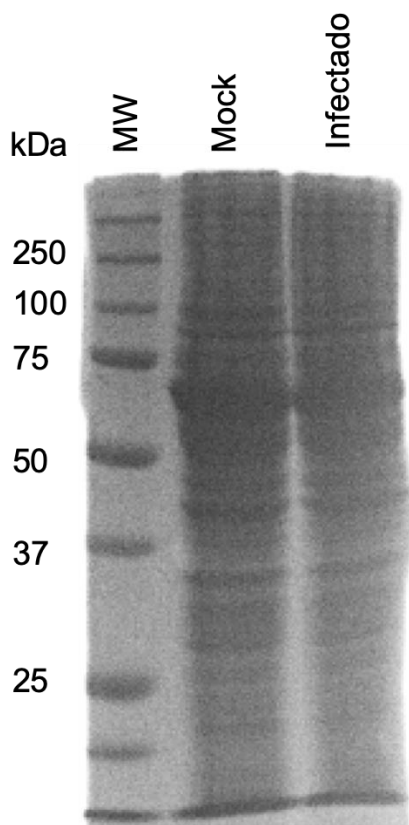


Figura 6 Perfil proteico de extractos de células U937-DC SIGN diferenciadas no infectadas e infectadas con DENV2. Extractos proteicos obtenidos de células U937-DC SIGN diferenciadas e infectadas o no con DENV2 por 12 horas fueron separados mediante electroforesis en SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. Los marcadores de peso molecular fueron corridos en el carril 1.

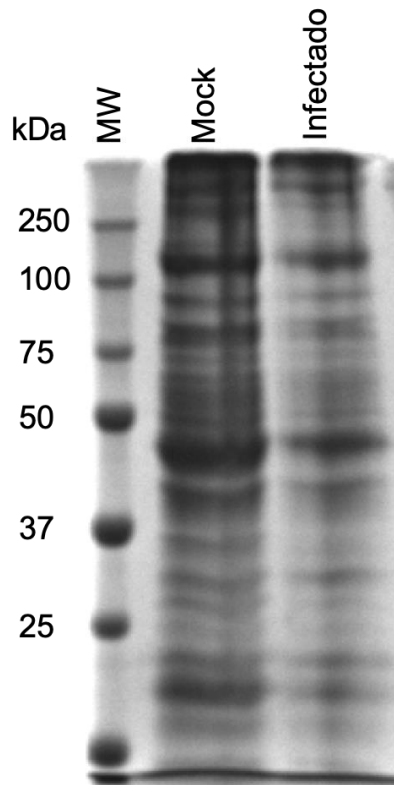


Figura 7 Perfil proteico de las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN no infectadas e infectadas con DENV2 a 12 horas. Los extractos proteicos fueron separados mediante electroforesis en SDS-PAGE y teñido con azul de Coomassie. Los marcadores de peso molecular fueron corridos en el carril 1.

8.2. Resultados obtenidos de la proteómica

Una vez aisladas las proteínas presentes en las vesículas extracelulares, estas fueron sometidas a análisis proteómico como se describió en materiales y métodos. Se identificaron 1,148 proteínas presentes en las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN que tuvieron una expresión diferencial, las cuales están implicadas en 221 vías metabólicas. Entre las proteínas identificadas se encontró la poliproteína del DENV, indicando que las células se infectaron; sin embargo, no pudimos saber cuáles de las proteínas virales están en nuestras muestras específicamente.

Se realizó el análisis de vías KEGG de las proteínas totales para conocer las posibles vías en las cuales están implicadas y cuál es su posible papel y función durante la infección de las células U937-DC-SIGN (Figura 8).

De las 221 posibles vías en las cuales están implicadas las 1,148 proteínas totales se encuentran 112 proteínas implicadas en el transporte, 87 ribonucleoproteínas, 51 proteasas, 30 del proteosoma, 30 implicadas en el procesamiento del mRNA, 27 proteínas de la respuesta inmune (20 proteínas del complemento) y 15 proteínas de respuesta al estrés.

A continuación, se muestra la red de interacción de cada grupo de proteínas:

Interacción proteína-proteína de las 112 proteínas de transporte (Figura 9). Interactoma de las 87 ribonucleoproteínas (Figura 10). Interactoma de las 51 proteasas (Figura 11). Interactoma de las 27 proteínas implicadas en la respuesta inmune (Figura 12). Interactoma de las 15 proteínas de la respuesta al estrés (Figura 13). Se realizó la red de interacción proteína-proteína de las 30 proteínas del proteosoma (Figura 14). Se hizo la red de interacción proteína-proteína de las 30 proteínas implicadas en el procesamiento del mRNA (Figura 15).

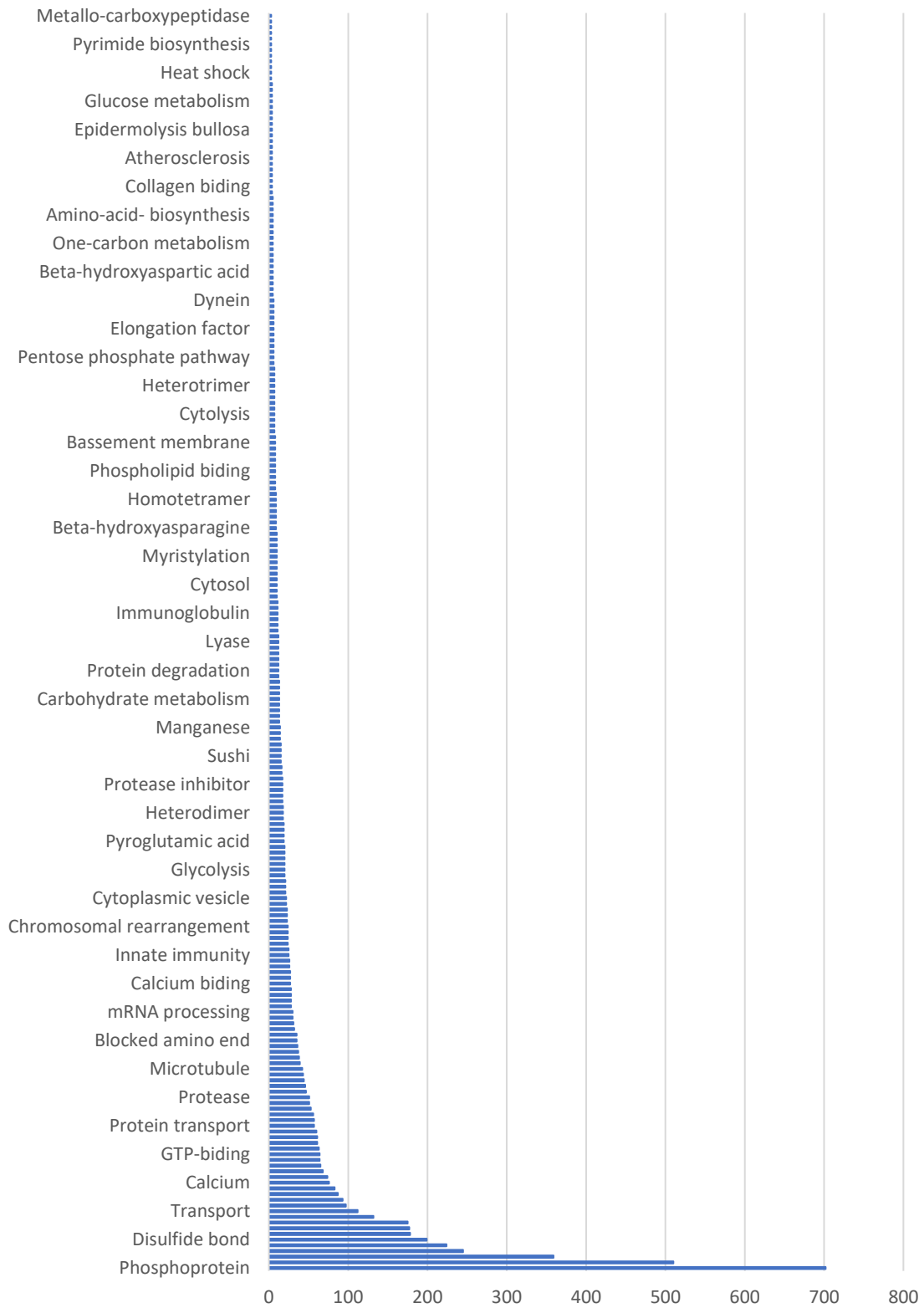


Figura 8 Análisis de vías KEGG de las proteínas totales (1,148 proteínas). Vías en las cuales posiblemente están implicadas las proteínas durante la infección de las células U937-DC-SIGN con DENV.

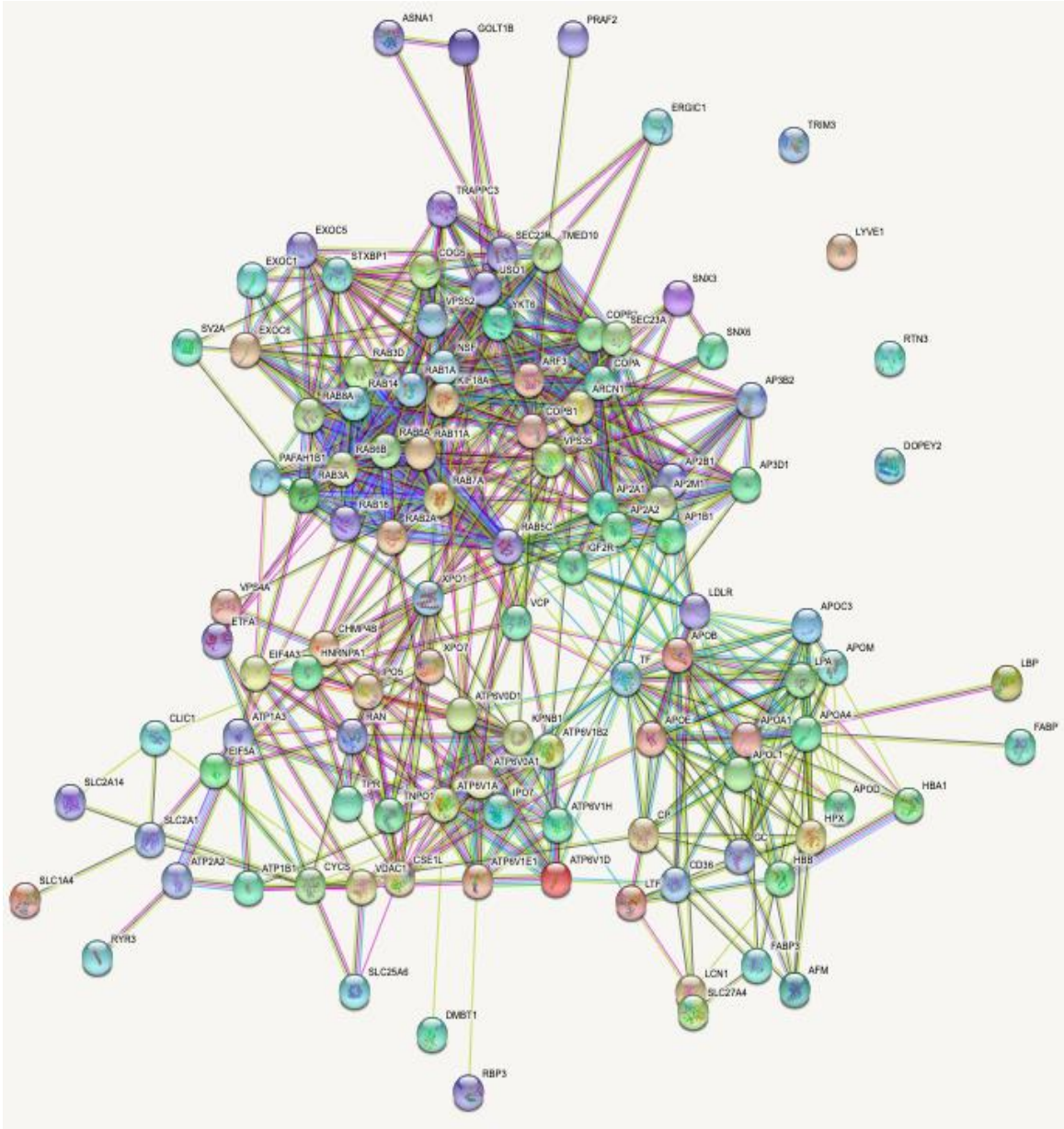


Figura 9 Interacción proteína-proteína de las 112 proteínas implicadas en transporte

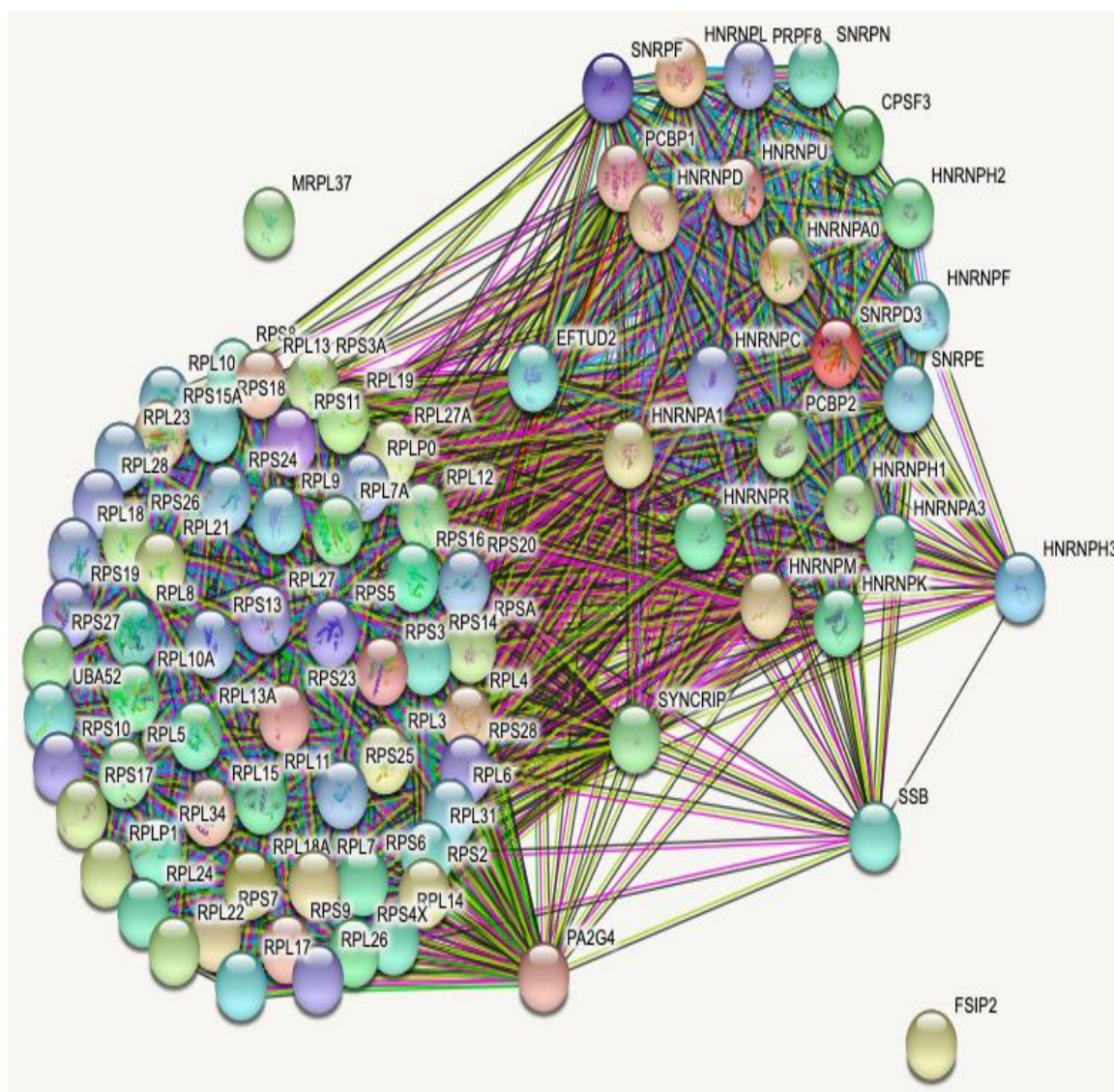


Figura 10 Interacción proteína-proteína de las 87 ribonucleoproteínas.

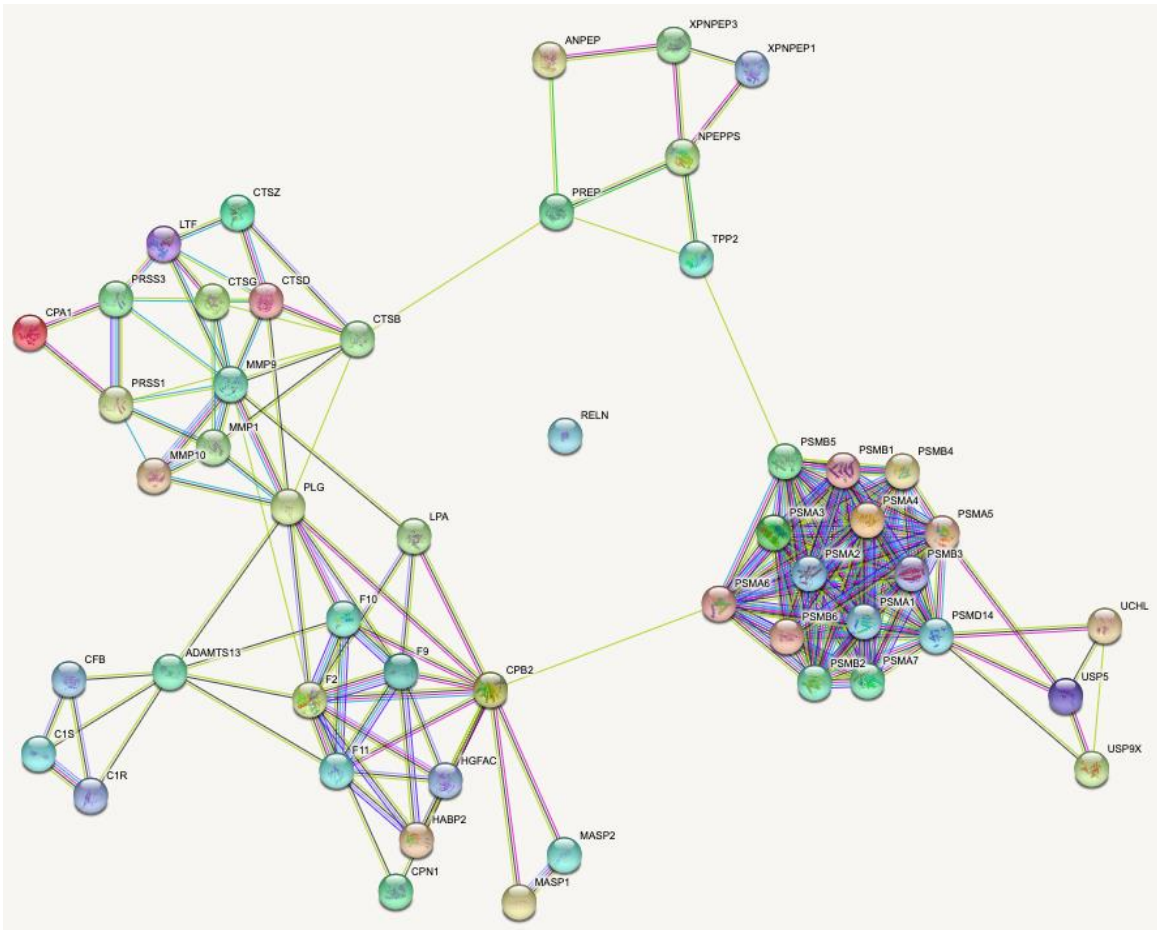


Figura 11 Interacción proteína-proteína de las 51 proteasa.

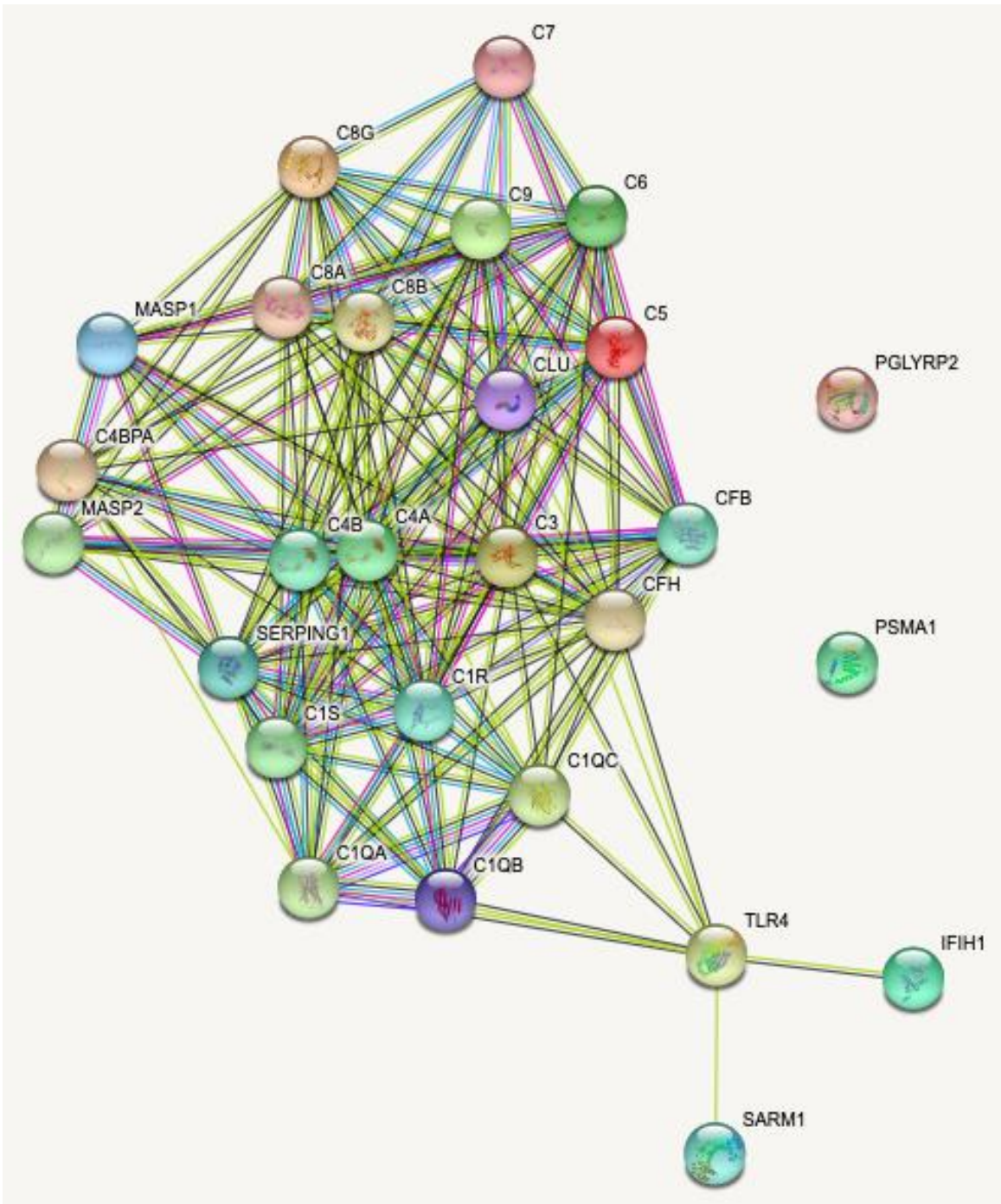


Figura 12 Interacción proteína-proteína de las 27 proteínas implicadas en la respuesta inmune.

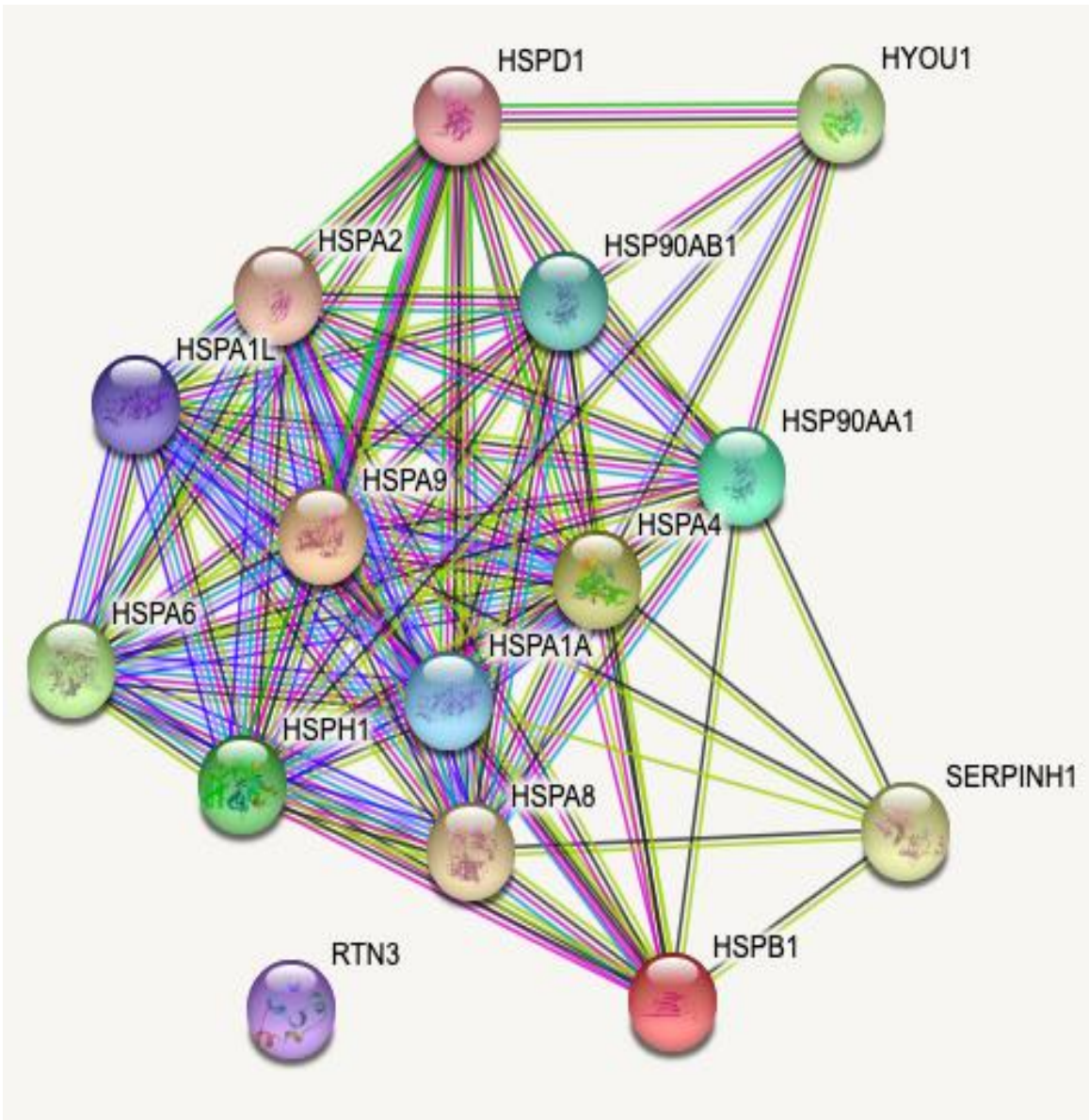


Figura 13 Interacción proteína-proteína de las 15 proteínas de la respuesta al estrés.

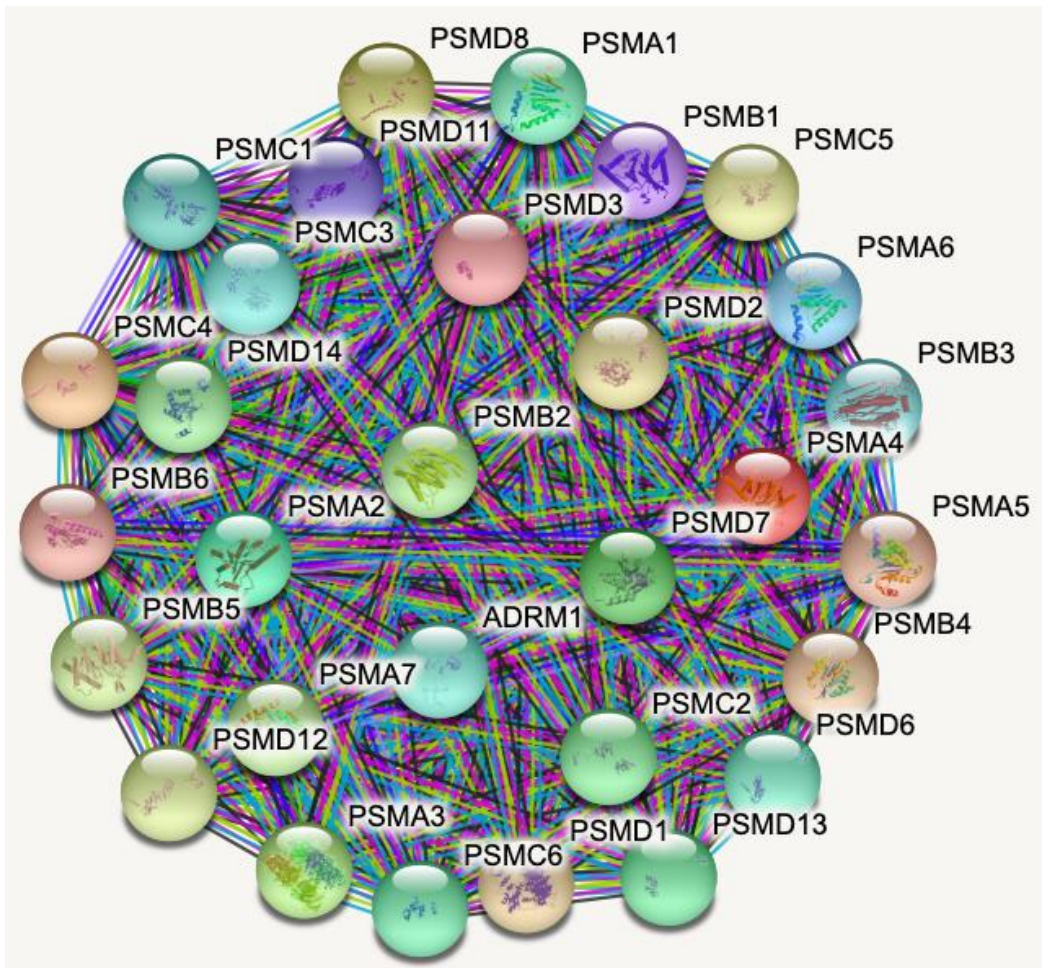


Figura 14 Interacción proteína-proteína de las 30 proteínas que conforman al proteosoma

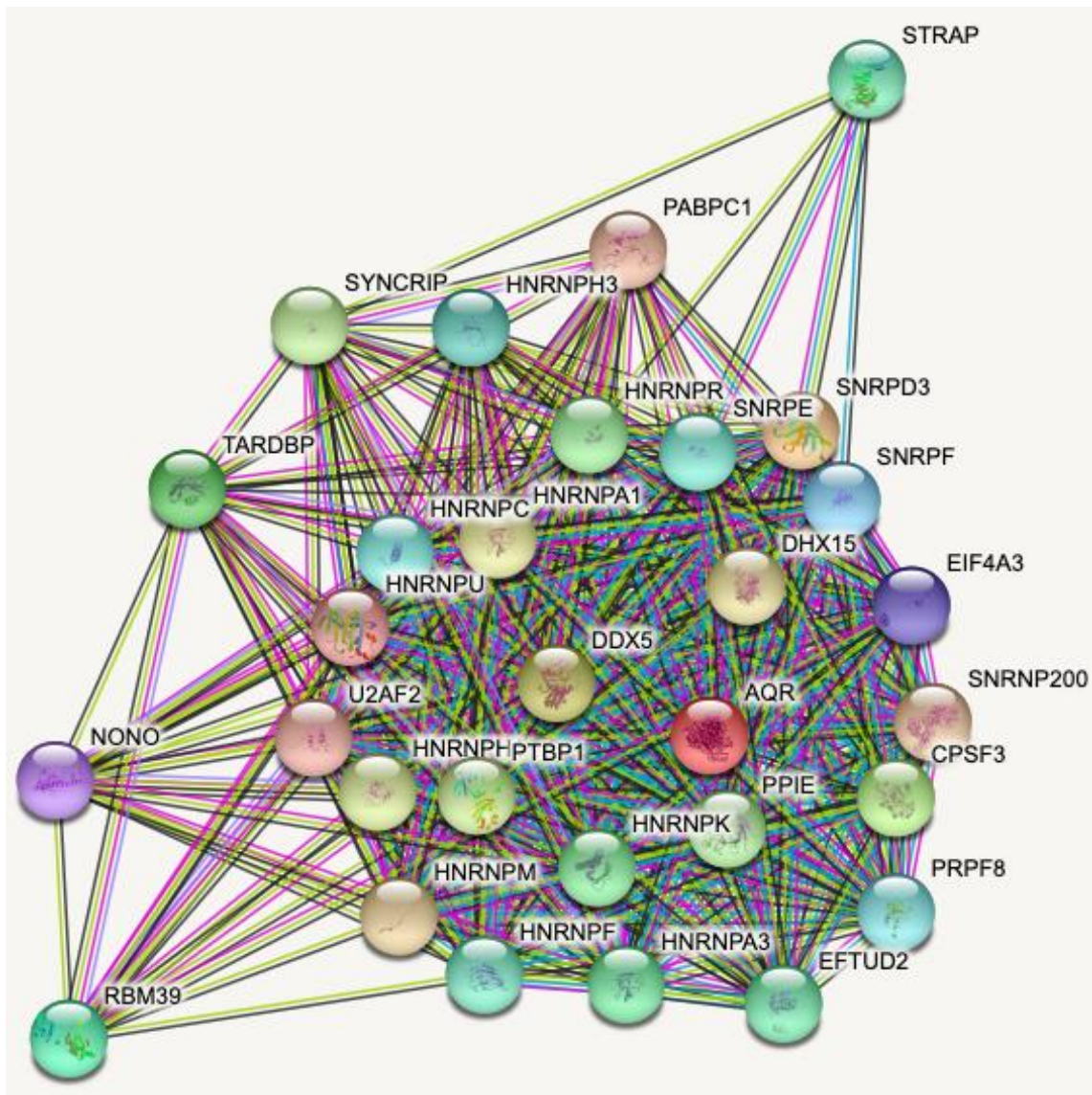


Figura 15 Interacción proteína-proteína de las 30 proteínas implicadas en el procesamiento del mRNA.

Una vez realizado el análisis del primer grupo de proteínas, se llevó a cabo un segundo tamizaje de las proteínas identificadas siguiendo los criterios de número de péptidos/péptidos únicos para ir segregando la información obtenida. De este filtro se obtuvo un total de 371 proteínas. La identificación de péptidos únicos se basa en la teoría “Ockham’s Razor theory -the explanation of any phenomenon should make as few assumptions as possible, eliminating those that make no difference of the explanatory hypothesis of theory”. Por esa razón se usaron los péptidos y los péptidos únicos los cuales no son comunes en más de una proteína.

A continuación, se decidió aplicar un nuevo filtro para continuar simplificando la información, ahora sacando el ratio de la abundancia de las proteínas de las vesículas de células infectadas entre la de las vesículas extracelulares de células no infectadas. Así, se obtuvieron 83 proteínas.

Entre estas 83 proteínas se encuentran ribonucleoproteínas (16 proteínas) (Tabla 2) y proteínas implicadas en el proceso de splicing de mRNA (5 proteínas) (Tabla 3) y proteínas que conforman al proteosoma (11 proteína) (Tabla 4).

Tabla 2 Ribonucleoproteínas encontradas en el estudio de proteómica de las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN.

UniProt	Nomenclatura	Nombre de la proteína	Fold change
P51991	HNRPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	16.353911
P07910	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	5.43299331
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2.86298035
Q9UQ80	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	4.67048096

P62913	RPL11	60S Ribosomal protein L11	11.3206312
P40429	RPL13A	60S Ribosomal protein L13a	11.3298465
P62829	RPL23	60S Ribosomal protein L23	5.41172173
P46777	RPL5	60S Ribosomal protein L5	4.09398718
P62424	RPL7A	60S Ribosomal protein L7a	4.53336905
P62263	RPS14	40S Ribosomal protein S14	7.67511262
P62244	RPS15A	40S Ribosomal protein S15a	4.09633093
P08708	RPS17	40S Ribosomal protein S17	6.27163995
P62854	RPS26	40S Ribosomal protein S26	2.04849868
P42677	RPS27	40S Ribosomal protein S27	5.16483876
P62701	RPS4X	40S Ribosomal protein S4, X isoform	4.43521847
P14866	HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	5.21208078

Tabla 3 Proteínas implicadas en el mRNA splicing encontradas en el estudio de proteómica de las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN.

UniProt	Nomenclatura	Nombre de la proteína	Fold change
P17844	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	2.02232739
Q13148	TARDBP	TAR DNA-binding protein 43	14.4298339
P51991	HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	16.353911
P07910	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	5.43299331
P61978	HNRNPK	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K	2.86298035

8.3. Proteínas del proteosoma

En la tabla 4 se muestran datos de las 11 proteínas que conforman al proteosoma en donde se puede observar su nomenclatura, su nomenclatura sistemática, el código en UniProt y el fold change de cada una de las proteínas.

Tabla 4 Proteínas del proteosoma encontradas en el estudio de proteómica de las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN

UniProt	HUGO (Human Genome Organization)	Nomenclatura sistemática	Otra nomenclatura	Nombre de la proteína	Fold change
P25786	PSMA1	$\alpha 6$	C2	Proteosoma subunidad alfa 1	3.30541386

P25787	PSMA2	$\alpha 2$	C3	Proteosoma subunidad alfa 2	4.33866035
P25789	PSMA4	$\alpha 3$	C9	Proteosoma subunidad alfa 4	3.08113959
P28066	PSMA5	$\alpha 5$	Zeta	Proteosoma subunidad alfa 5	6.12361174
P60900	PSMA6	$\alpha 1$	Iota	Proteosoma subunidad alfa 6	5.44437607
P49721	PSMB2	$\beta 4$	C7	Proteosoma subunidad beta 2	5.53798034
P28070	PSMB4	$\beta 7$	N3, beta	Proteosoma subunidad beta 4	2.24553249
P28072	PSMB6	$\beta 1$	Y, delta	Proteosoma subunidad beta 6	5.63795995
P17980	PSMC3	Rpt5	S6', Tbp1	26S Proteosoma subunidad reguladora ATPasa 3	4.10350204
P62333	PSMC6	Rpt4	S10b, p42	26S Proteosoma subunidad reguladora ATPasa 6	1.88718732
Q13200	PSMD2	Rpn1	S2, p97	26S Proteosoma subunidad reguladora no ATPasa 2	6.11025247

También encontramos a la proteína STAT1, entre las múltiples funciones, se ha reportado que DENV utiliza las proteínas NS para bloquear las vías del receptor IFN α/β (IFNAR; Uno & Ross, 2018). En la tabla 5 se encuentra el código de UniProt, el nombre de la proteína y su fold change.

Tabla 5 Descripción de la proteína STAT1

UniProt	Nomenclatura	Nombre de la proteína	Fold change
P42224	STAT1	Signal transducer and activador of transcription	4.07243024

8.4. Validación del análisis proteómico

8.4.1. Cinética de PSMA1

Con el fin de validar la información que obtuvimos en el análisis proteómico y de confirmar en los exosomas la presencia de marcadores de estas vesículas, se realizaron ensayos de Western-blot. Inicialmente validamos la presencia de la presencia en los exosomas de las tetrasparinas CD9, CD63 y CD81 y de la proteína HSP70, marcadores de exosomas. Como puede observarse, (Figura 16) se encontró la presencia de las tres tetraspaninas y de la proteína HSP70 en los exosomas aislados de células no infectadas e infectadas con DENV2, lo cual confirma la presencia de exosomas en la fracción de vesículas extracelulares.

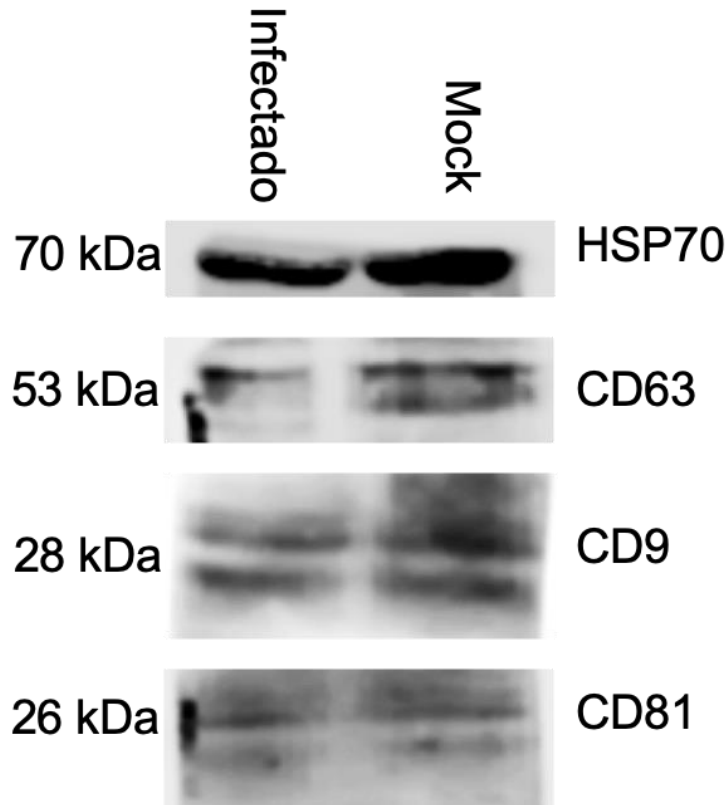


Figura 16 Western blot de los marcadores de exosomas (HSP70, CD63, CD9 y CD81).

Una vez confirmada la presencia de los marcadores de exosomas y para validar la información obtenida de la proteómica realizamos una cinética de infección en donde se obtuvieron las proteínas de las vesículas extracelulares del sobrenadante de las células infectadas a las 0, 6, 12, 24, 48 horas post-infección así como de células no infectadas. La abundancia de las proteínas PSMA1 y PSMA4 presentes en las muestras de vesículas extracelulares derivadas de células infectadas se compararon con las de no infectadas.

Primero se evaluó la presencia de la subunidad PSMA1 del proteosoma y a las 0 horas no se encontró presencia de la proteína en ninguna de las dos condiciones a evaluar. A las 12 y 24 horas se observó una mayor expresión de proteínas en las condiciones de Mock (figura 17). Se utilizó CD63 como marcador de exosomas y solo pudimos observarla en células infectadas.

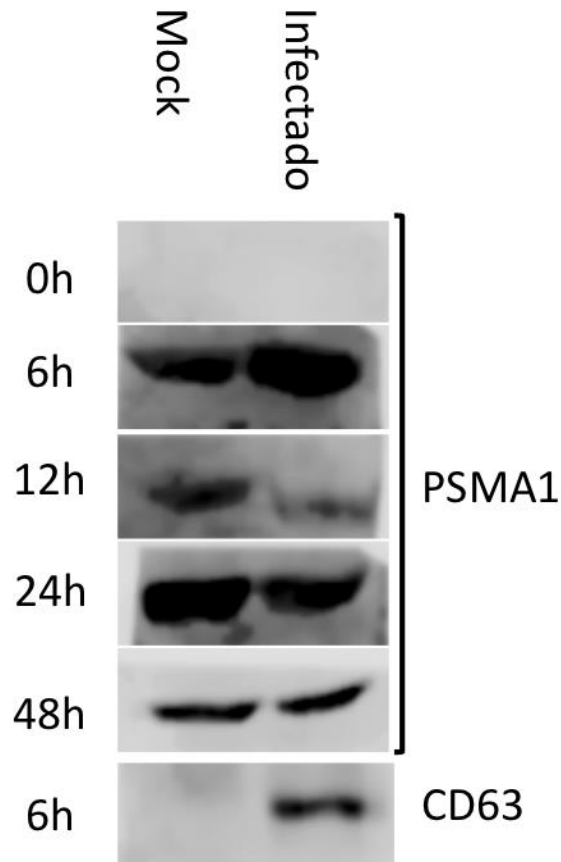


Figura 17 Cinética de la subunidad PSMA1 del proteosoma a 0, 6, 12, 24 y 48 horas postinfección. CD63 se puede observar solo en las vesículas extracelulares liberadas por células U937-DC-SIGN infectadas con DENV.

8.4.2. Cinética de PSMA4

La segunda subunidad que se evaluó fue PSMA4 y aquí pudimos observar una tendencia de una mayor expresión de esta subunidad en las condiciones de infección (Figura 18). Al igual que en la imagen anterior solo pudimos observar la presencia de CD63 en células infectadas.

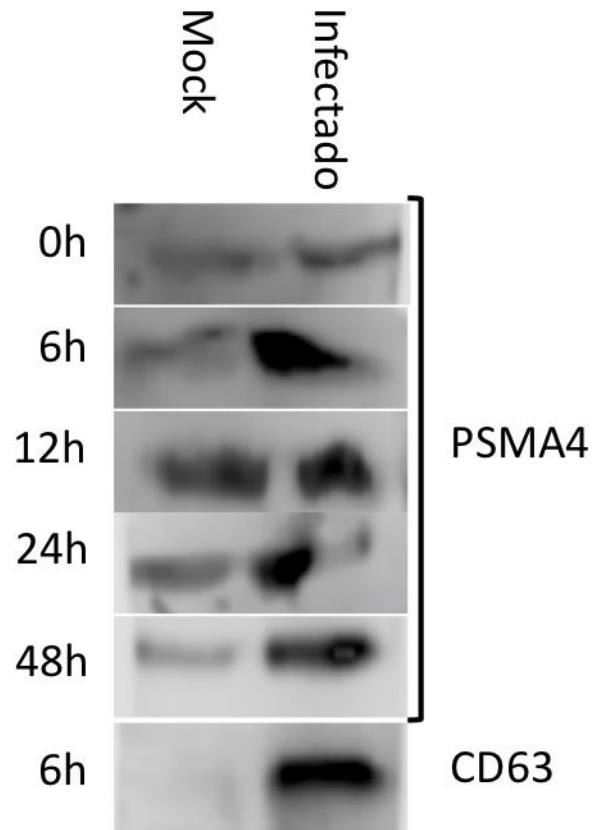


Figura 18 Cinética de la subunidad PSMA4 del proteosoma a 0, 6, 12, 24 y 48 horas postinfección. CD63 se puede observar solo en las vesículas extracelulares liberadas por células U937-DC-SIGN infectadas con DENV.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los exosomas que contienen proteínas y RNAs derivados de patógenos pueden promover infecciones de tres maneras: 1) mediando infecciones mediante la transmisión de moléculas relacionadas con patógenos; 2) participando en el escape inmune de patógeno; y 3) inhibiendo la respuesta inmune favoreciendo la apoptosis de las células inmunes. Su contraparte de las funciones de los exosomas son funciones contra la infección a través de: 1) inhibir la proliferación e infección de patógenos directamente; e 2) induciendo respuestas inmunes tales como aquellas relacionadas con la función de los monocitos-macrófagos, células NK, células T y células B (Zhang *et al.*, 2018). Sin embargo, aún se desconoce el contenido proteico de estas vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV2, así como también se desconoce su posible función durante la infección. Por ello en el presente trabajo se identificaron y analizaron las proteínas que conforman a los exosomas derivados de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV2 y células U937-DC-SIGN sin infectar.

Al realizar el análisis proteómico de las vesículas extracelulares se pudieron identificar algunas de las 100 proteínas reportadas en diferentes exosomas (Mathivanan *et al.* 2010A). Entre de las proteínas identificadas se encontraron proteínas ribosomales, de transporte, del proteosoma, del complemento, de procesamiento del mRNA, proteasas y de respuesta al estrés.

A partir del análisis KEGG identificamos un grupo de proteínas de interés: proteasas, proteínas del complemento y proteínas que conforman al proteosoma. Las serinas proteasas forman una gran familia de enzimas de clivaje de proteínas que juegan un papel esencial en procesos como la coagulación de la sangre, la apoptosis y la inflamación. Las células inmunes expresan una amplia variedad de serina proteasas tales como granzimas en linfocitos citotóxicos, elastasa de neutrófilos, catepsina G y proteínasa 3 en neutrófilos y quimasa y triptasa en mastocitos (Heutinck *et al.*, 2010). Dentro de las proteasas que se encontraron en análisis de vías KEGG se encontraron serina proteasas (PRSS1 y PRSS3); factores de coagulación (F2, F9, F10 y F11); proteasas que forman parte de la vía

del complemento (C1R y C1S); y proteasas que forman parte del proteosoma (PSMD14, PSMA1, PSMA2, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB5 y PSMB6). Por ello, se decidió analizar estas vías para conocer su posible papel durante la infección de células U937-DC-SIGN con DENV.

Los resultados obtenidos de la proteómica de vesículas extracelulares nos llevan a cuestionar su posible papel en el proceso infeccioso o cómo es que estas vesículas pueden ayudar a combatir la infección, ya que los exosomas ejercen un efecto regulador bidireccional en las infecciones por patógenos al entregar su contenido.

Se encontraron 20 proteínas del complemento lo cual concuerda con la ya reportado por Fragnoud y colaboradores en el 2015. En dicho estudio compararon los proteomas de las fracciones enriquecida con viriones purificados de grupos de plasma de pacientes con dengue o dengue grave. En donde encontraron que las proteínas celulares del huésped identificadas en el análisis están principalmente involucradas en la cascada de coagulación, vía del complemento y en la vía de señalización de respuesta de fase aguda.

Se ha propuesto que DENV puede evadir la respuesta del complemento utilizando a la proteína NS1. NS1 inhibe la formación de la convertasa C3 de la vía clásica al unirse a C4, C1s y C4b (Avirutnan *et al.*, 2010). NS1 también protege a DENV de la neutralización al unirse a MBL (Thimmeca *et al.*, 2016). Para bloquear la formación de MAC, NS1 se unirá a los reguladores de vitronectina o inhibirá la polimerización de C9 (Conde *et al.*, 2016). La unión de NS1 a la agrupación de factores inhibitorios del complemento también inhibirá la formación de MAC (Figura 16; Kurosu *et al.*, 2007; Uno & Ross, 2018).

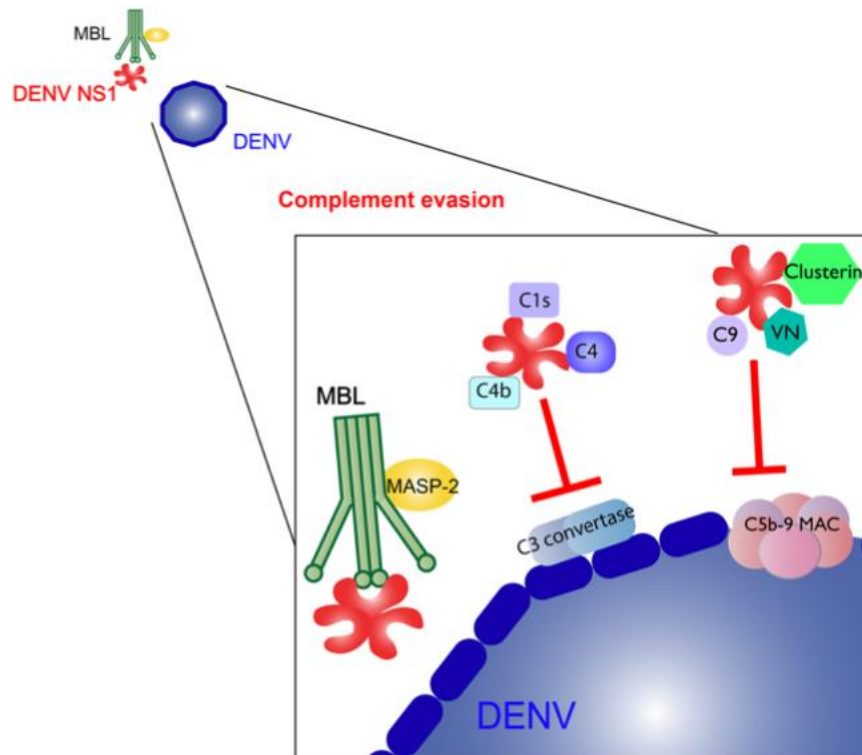


Figura 19 DENV evasión del complemento (Uno & Ross, 2018).

Posiblemente, las vesículas extracelulares liberadas de las células U937-DC-SIGN durante la infección por DENV a las 12h post-infección envían una serie de proteínas implicadas en la vía del complemento para evitar la propagación del virus.

En el análisis proteómico se encontró la presencia de 11 proteínas que conforman al proteosoma 26S, una ubiquitina E3 y STAT1. El proteosoma 26S pertenece al sistema ubiquitin-proteosoma (UPS). En las células eucariotas, el UPS es la principal vía intracelular para la degradación y modificación funcional de las proteínas celulares. La alteración de las subunidades del proteosoma se ha encontrado en exosomas secretados por macrófagos asociados a tumores (TAMs) y en vesículas extracelulares secretadas por hepatocitos de rata en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014). Se ha reportado que los virus incluyendo a HBV, pueden subvertir o manipular la maquinaria celular del UPS para favorecer la propagación viral y evadir la respuesta inmune del huésped (Jia *et al.*, 2017).

Jia y colaboradores en el 2017, confirmaron que los niveles de varias subunidades del complejo del proteosoma (PSMC1, PSMC2, PSMD1 y PSMD7) aumentaron en HepAD38 (dox-)-exo en comparación con HepAD38 (dox+)-exo y estas proteínas confirieron una actividad aumentada del proteosoma en HepAD38 (dox-)-exo en comparación con HepAD38 (dox+)-exo. Al mismo tiempo, la actividad proteolítica de los extractos celulares no mostró diferencias significativas. Estos resultados sugieren que las subunidades del proteosoma se empaquetaron selectivamente en las vesículas, las cuales tras la secreción de las células replicantes de HBV pueden armar a las células receptoras aumentando el proteosoma.

Posiblemente las vesículas extracelulares liberadas de células U937-DC-SIGN durante la infección por DENV, empaqueten selectivamente las subunidades del proteosoma para evadir la respuesta inmune y continuar su replicación viral.

La cinética de PSMA1 muestra una disminución en la cantidad de proteína presente en las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas en comparación con el grupo Mock. Sin embargo, en la cinética de PSMA4 se puede observar una clara tendencia de mayor proteína en las vesículas extracelulares liberadas por células infectadas en comparación con las no infectadas, esta tendencia se puede observar en todos los tiempos a evaluar.

De las otras proteínas involucradas en la vía de degradación de proteínas está presente STAT1. En caso de DENV se ha reportado que utiliza las proteínas NS para bloquear las vías del receptor $IFN\alpha/\beta$ (IFNAR). El complejo NS2a, NS4a y NS4b es responsable de subvertir la respuesta $IFN\alpha/\beta$ mediante la inhibición de la señalización de STAT1 después de la activación de IFNAR *in vitro* (Muñoz-Jordán *et al.*, 2003; Uno & Ross, 2018). Por otro lado, la NS5 inhibe la respuesta mediada por IFN a través de STAT2 mediante la unión con la proteína del huésped ubiquitina E3 ligasa para la degradación proteosomal de STAT2 (Figura 17; Morrison *et al.*, 2013; Uno & Ross, 2018).

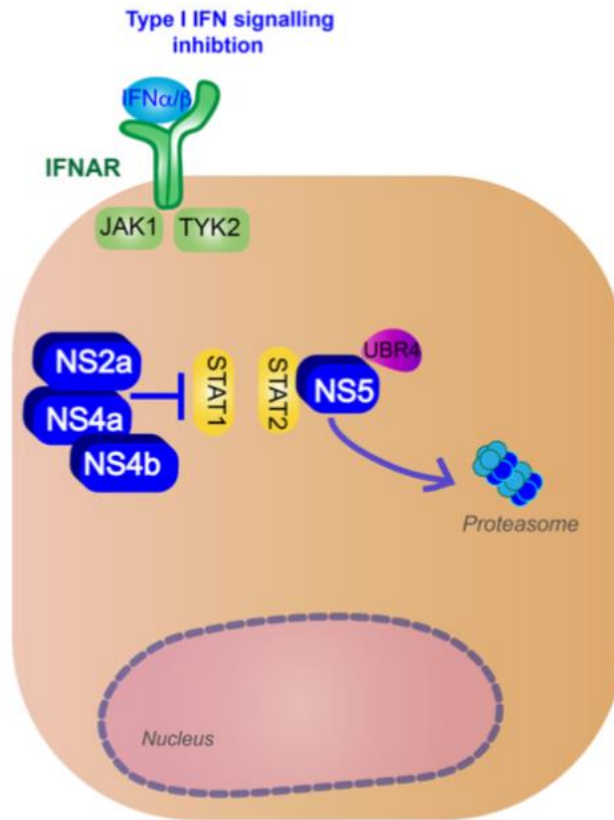


Figura 20 Inhibición del IFN de tipo I por DENV (Uno & Ross, 2018).

Al realizar la cinética de las subunidades PSMA1 y PSMA4 se utilizó como control a CD63, sin embargo, CD63 solo se pudo observar en las VE liberadas por células U937-DC-SIGN infectadas con DENV y no se obtuvo ninguna banda en las VE de células no infectadas. El Western blot de CD63 se realizó a 0, 6, 12, 24 y 48 post-infección y se realizó una repetición, obteniendo como resultado la presencia de CD63 solo en las muestras de VE liberadas por células U937-DC-SIGN infectadas, posiblemente se deba a que CD63 es un marcador de exosomas y posiblemente las VE obtenidas de células U937-DC-SIGN sin infectar liberen una mayor cantidad de microvesículas y pocos exosomas, por ello se ha pensado en utilizar el fármaco GW4869, ya que dicho fármaco inhibe la gemación interna mediada por ceramida de MVBs y la liberación de exosomas maduros de los MVBs (Essandoh *et al.*, 2015).

La utilización de GW4869 nos ayudará a corroborar si las muestras obtenidas de VE liberadas por células U937-DC-SIGN infectadas o no infectadas liberan exosomas o si se encuentra una mezcla de microvesículas con exosomas. También se necesita corroborar el tamaño y la morfología de las VE mediante microscopía electrónica

En resumen, las vesículas extracelulares derivadas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV, contienen subunidades confirmadas del proteosoma (PSMA1 y PSMA4) y también marcadores de exosomas como las tetrasparinas (CD9, CD63 y CD81) y la proteína HSP70. Sin embargo, aún se desconoce el posible papel de las subunidades del proteosoma durante la infección de células U937-DC-SIGN con el DENV, ya que en este trabajo nos centramos en demostrar la presencia de dos subunidades del core del proteosoma 26S, las cuales efectivamente se encuentran dentro del contenido cargo de las VE. Por lo cual es de nuestro interés identificar el contenido proteico de las vesículas extracelulares y contribuir a una línea de investigación de un área que aún no se ha explorado.

10. CONCLUSIONES

- Se encontró la presencia de las tetrasparinas (CD9, CD63 y CD81) y HSP70 en las vesículas extracelulares aisladas de células U937-DC-SIGN sugiriendo que éstas son exosomas; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de tener una mezcla de microvesículas y exosomas.
- Se identificaron 1148 proteínas en las vesículas extracelulares, las cuales pueden estar implicadas en 221 vías.
- Se encontró la presencia de la poliproteína de DENV en el análisis proteómico de las VE liberadas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV.
- El análisis proteómico muestra la presencia de proteínas que conforman al proteosoma las cuales se pudieron comprobar por WB la presencia de las subunidades PSMA1 y PSMA4.

11.PERSPECTIVAS

- Corroborar el tamaño y la morfología de las vesículas extracelulares mediante microscopia electrónica
- Corroborar la presencia de las otras subunidades del proteosoma en las vesículas extracelulares en presencia de GW4859
- Determinar si incrementa la actividad proteosomal en las células que entran en contacto con las vesículas extracelulares provenientes de células infectada por DV.
- Corroborar si las vesículas provenientes de células infectada por DV tienen actividad proteosomal incrementada

12. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez D. E., Lodeiro M. F., Filomatori C. V., Fucito S., Mondotte J. A. y Gamarnik A. V. (2006). Structural and functional analysis of dengue virus RNA. *New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases: Novartis Foundation Symposium 277*. 120-135.
- Angel RMd y Valle JR-d. (2013). Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. *PLoS Pathog.* 9(10): e1003551. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003551.
- Avirutnan P., Fuchs A., Hauhart R. E., Somnuk P., Youn S., Diamond M. S. y Atkinson J. P. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *The Journal of Experimental Medicine.* 12;207(4):793-806.
- Bäck A. T. & Lundkvist A. (2013). Dengue viruses – an overview. *Infection Ecology and Epidemiology.* 3: 19839.
- Chahar H. S., Bao X. & Casola A. (2015). Exosomes and Their role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses. *Viruses.* 7, 3204-3225.
- Conde J. N., da Silva E. M., Allonso D., Coelho D. R., Andrade I. D. S., de Medeiros L. N., Menezes J. L., Barbosa A. S. y Mohana-Borges R. (2016). Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *Journal of Virology.* 14;90(21):9570-9581.
- Egloff M-P., Benarroch D., Selisko B., Romette J-L. y Canard B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal.* Vol. 21. No. 11. 2757-2768.
- Essandoh K., Yang L., Wang X., Huang W., Qin D., Hao J., Wang Y., Zingarelli B., Peng T. y Fan G-C. (2015). Blockade of Exosome Generation

with GW4869 Dampens the Sepsis-induced Inflammation and Cardiac Dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1852(11): 2362-2371.

- Fragnoud R., Flamand M., Reynier F., Buchy P., Doung V., Pachot A., Paranhos-Baccala G. y Bedin F. (2015). Differential proteomic analysis of virus-enriched fractions obtained from plasma pools of patients with dengue fever or severe dengue. *Infectious Diseases*. 15:518.
- Futter C. E. y White I. J. (2007). Annexins and Endocytosis. *Traffic*. 8: 951-958.
- Haraszti R. A., Didiot M-C., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S. A., Rockwell H. E., Gao F., Narain N. R., DiFiglia M., Kiebish M. A., Aronin N. y Khvorova A. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles*. 5: 32570.
- Henchal E. A. & Putnak J. R. (1990). The Dengue Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 3. No. 4. 376-396.
- Heutinck K. M., Berge I. J. M., Hack C. E., Homann J. y Rowshani A. T. (2010). Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology*. 47. 1943-1955.
- Jeanin P., Chaze T., Gianetto Q. G., Matondo M., Gout O., Gessain A. y Afonso P. V. (2018). Proteomic analysis of plasma extracellular vesicles reveals mitochondrial stress upon HTLV-1 infection. *Scientific Reports*. 8:5170.
- Jia X., Chen J., Megger D. A., Zhang X., Kozlowski M., Zhang L., Fang Z., Chu Q., Wu M., Li Y., Sitek B. y Yuan Z. (2017). Label-free Proteomic Analysis of Exosomes Derived from Inducible Hepatitis B Virus-Replicating HepAD38 Cell Line. *Molecular & Cellular Proteomics*. 16 supplement 4. S144-S160.
- Kurosu T., Chaichana P., Yamate M., Anantapreecha S. y Ikuta K. (2007). Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue

virus nonstructural protein 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362. 1051-1056.

- Lindenbach B. D. y Rice C. M. (2003). *Molecular Biology of Flaviviruses*. *Advances in Virus Research*. Vol. 59. 23-61.
- Lindenbach B. D., Thiel H-J. y Rice C. M. (2007). Chapter 33: Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott-Raven Publishers. 1101-1152.
- Ma L., Jones C. T., Groesch T. D., Kuhn R. J. y Post C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9; 101(10):314-9.
- Martins S. T., Kuczera D., Lötvall J., Bordignon J. y Alves L. R. (2018). Characterization of Dendritic Cell-Derived Extracellular Vesicles During Dengue Virus Infection. *Frontiers in Microbiology*. 9:1792. Doi. 10.3389/fmicb.2018.01792.
- Mathivanan S., Ji H. y Simpson R. J. (2010A). Exosomes: Extracellular organelles important in intracellular communication. *Journal of Proteomics*. 73. 1907-1920.
- Mathiavanan S., Lim J. W., Tauro B. J., Ji H., Moritz R. L. y Simpson R. J. (2010B). Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Molecular & Cellular Proteomics*. 9(2): 197-208.
- Mears R., Craven R. A., Hanrahan S., Totty N., Upton C., Young S. L., Patel P., Selby P. J. y Banks R. E. (2004). Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 4. 4019-4031.
- Meckes Jr. D. G. y Raab-Traub N. (2011). Microvesicles and viral infection. *Journal of Virology*. 85, 12844-12854.

- Messina J. P., Brady O. J., Golding N., Kraemer M. U. G., Wint G. R. W., Ray S. E., Pigott D. M., Shearer F. M., Johnson K., Earl L., Marczak L. B., Shirude S., Weaver N. D., Gilbert M., Velayudhan R., Jones P., Jaenisch T., Scott T. W., Reiner R. C. y Hay S. I. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature microbiology*. doi: 10.1038/s41564-019-0476-8.
- Morrison J., Laurent-Rolle M., Maestre A. M., Rajsbaum R., Pisanelli G., Simon V., Mulder L. C. F., Fernandez-Sesma A. y García-Sastre A. (2013). Dengue Virus Co-opts UBR4 to Degrade STAT2 and Antagonize Type I Interferon Signaling. *PLoS Pathogens*. 9(3): e1003265. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003265.
- Muñoz-Jordán J., Sánchez-Burgos G. G., Laurent-Rolle M. y García-Sastre A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 25;100(24):14333-8.
- Pegtel D. M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D. A., von Eijndhoven M. A. J., Hopmans E. S., Lindenberg J. L., de Gruijl T. D., Würdinger T. y Middeldorp J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 107. No. 14. 6328-6333.
- Perera R. & Kuhn R. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current Opinion in Microbiology*. 11(4): 369-377.
- Reyes-Ruiz J. M., Osuna-Ramos J. F., De Jesús-González L. A., Hurtado-Monzón A. M., Farfan-Morales C. N., Cervantes-Salazar M., Bolaños J., Cigarroa-Mayorga O. E., Martín-Martínez E. S., Medina F., Fragoso-Soriano R. J., Chávez-Munguía B., Salas-Benito J. S. y Del Angel R. M. (2019). Isolation and characterization of exosomes released from mosquito cells infected with dengue virus. *Virus Research*. 266:1-14. Doi: 10.1016/j.virusres.2019.03.015.

- Rodríguez-Suárez E., Gonzalez E., Hughes C., Conde-Vancells J., Rudell A., Royo F., Palomo L., Elortza F., Lu S. C., Mato J. M., Vissers J. P. C. y Falcón-Pérez J. M. (2014). Quantitative proteomic analysis of hepatocyte-secrete extracelular vesicles reveals candidate markers for liver toxicity. *Journal of Proteomics*. 30; 103: 227-240.
- Schey K. L., Luther J. M. y Rose K. L. (2015). Proteomics Characterization of Exosome Cargo. *Methods*. 1; 87: 75-82.
- Schorey J. S., Cheng Y., Singh P. P. y Smith V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports*. 16(1):24-43.
- Stanaway J. D., Shepard D. S., Undurraga E. A., Halasa Y. A., Coffeng L. E., Brady O. J., Hay S. I., Bedi N., Besenor I. M., Castañeda-Orjuela C. A., Chuang T-W., Gibney K. B., Memish Z. A., Rafay A., Ukwaja K. N., Yomemoto N. y Murray C. J. L. (2016). The Global Burden of Dengue: an analysis from the global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet infectious Diseases*. 16(6): 712-723.
- Thiemmecca S., Tmdej C., Punyadee N., Prommool T., Songjaeng A., Noisakran S., Puttikhunt C., Atkinson J. P., Diamond M. S., Ponlawat A. y Avirutnan P. (2016). Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Biding Lectin-Mediated Neutralization. *Journal of Immunology*. 15;197(10):4053-4065.
- Uno N. & Ross T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging Microbes & Infections*. 7:167. DOI 10.1038/s41426-018-0168-0.
- World Health Organization. (2019). Dengue y dengue grave. Consultado el 5 de julio de 2019. En: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

- Zhang J., Li S., Li L., Li M., Guo C., Yao J. y Mi S. (2015). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13. 17-24.
- Zhang W., Jiang X., Bao J., Wang Y., Liu H. y Tang L. (2018). Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Fuctions. *Frontiers in Immunology*. 9:90. Doi 10.3389/fimmu.2018.00090.
- Zhou W., Woodson M., Neupane B., Bai F., Sherman M. B., Choi K. H., Neelakanta G. y Sultana H. (2018). Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells. *PLOS Pathogens*. 36 p.
- Zhu X., He Z., Yuan J., Wen W., Huang X., Hu Y., Lin C., Zhou R., Wu J., Li J. y Li M. (2015). IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cellular Microbiology*. 17(1), 105-118.