



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS
Huh 7 INFECTADAS CON VIRUS DEL DENGUE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Q.B.P. MYRIAM GUADALUPE RODRIGUEZ GANDARILLA

TUTOR PRINCIPAL

DR. CESAR FERREIRA BATISTA

Instituto de Biotecnología UNAM (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS (IBT-UNAM)

DR. TOMAS LÓPEZ DÍAZ (IBT-UNAM)

DRA. ROSA VICTORIA PANDO ROBLES (Instituto Nacional de Salud Pública)

Cuernavaca, Morelos

Agosto, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UPRO-UNAM). Bajo la dirección del Dr. Cesar Ferreira Batista. Fue financiado parcialmente con recursos de la UPRO.

Una parte de este trabajo se realizó en la Unidad de Proteómica del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública. Bajo la tutoría de la Dra. Victoria Pando Robles

El sustentante Myriam Guadalupe Rodríguez Gandarilla, con Número de registro 369602, agradece a CONACYT la beca otorgada No. 53448.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca No. 53448 brindada para la realización de esta tesis.

Al Dr. Cesar Batista por permitirme ser parte de su grupo y enseñarme espectrometría de masas

A la Dra Victoria Pando por sus enseñanzas, su apoyo y consejos.

A mi comité tutorial

Dra. Rosa Uribe, Dr. Tomas Lopez, por sus comentarios y sugerencias al realizar este trabajo.

A los jurados de mi examen de grado:

Dra. Isabel Salazar, Dra. Rosa Maria del Angel, Dra. Rosario Vera, Dr. Carlos Arias y Dr. Enrique Rudiño, por el tiempo que se tomaron en leer mi tesis, por sus correcciones y sugerencias que enriquecieron enormemente este escrito y mi formación.

A todas las personas que me prestaron algún reactivo o un equipo, me explicaron una técnica, en especial:

Al Dr. Humberto Lanz por permitirme usar su cuarto de cultivo y equipos de su laboratorio.

A la Dra. Martha Argüello, al Dr. Javier Izquierdo gracias por sus enseñanzas.

A la Dra Angélica Meneses por su ayuda con el citómetro de flujo.

A las técnicas de la Unidad de Proteómica del IBT: Ericka Meneses, Lorena Hernandez y Lina Rivillas

A mis compañeros de laboratorio tanto de la unidad de proteómica del IBT, como del INSP:

Emmanuel, Valeria, Gris, Víctor y Antonio gracias por el tiempo que compartimos juntos en el laboratorio.

A mi familia:

Mi mamá Lucy Gandarilla por su cariño, su apoyo incondicional, por creer en mí y enseñarme a no rendirme, a mi papá Rafael Rodríguez (qdep) por enseñarme a siempre buscar el éxito.

A mis hermanos Luz, Flor y Gerardo

A mis abuelitos Linda y Felipe por sus oraciones,

A mi tío Anselmo Gandarilla por su apoyo

A Eliseo Alvidrez por estar al lado de mi mamá, siempre pendiente de lo que necesitáramos

A Luis Alberto Casorla por los buenos momentos juntos.

A mis amigos:

José Luis Guevara, Roció Medina y Juan Roberto Muñoz gracias por su amistad aunque lejos siempre estuvieron para escucharme, para darme ánimos y recordarme quien era. Porque cuando voy a Chihuahua nuestra amistad sigue siendo la misma, como si nos hubiéramos visto el día anterior y gracias por llevarme a comer la comida que tanto he extrañado estando aquí.

A todas las personas que contribuyeron para que pudiera realizar este trabajo y que por descuido omití, una disculpa.

Gracias a todos

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 GENERALIDADES DEL DENGUE.....	2
Epidemiología de la enfermedad	3
Características del virus del dengue	6
Ciclo de replicación del virus dengue	12
Patogénesis del dengue	16
1.2. PROTEÓMICA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS: UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN VIRUS-HOSPEDERO	18
Espectrometría de masas (MS)	19
Fragmentación en tándem (MS/MS)	25
Identificación de proteínas por Espectrometría de masas	25
Proteómica cuantitativa.....	26
ITRAQ	27
SILAC	29
II. ANTECEDENTES.....	31
III. HIPÓTESIS.....	37
IV. OBJETIVOS	37
V. METODOLOGÍA.....	38
5.1. CÉLULAS	42
5.2. PREPARACIÓN DEL STOCK VIRAL	43
Propagación del DENV	43
Titulo viral	44
5.3. INFECCIÓN EN CÉLULAS HUH 7	45
Determinación del porcentaje de células infectadas mediante citometría de flujo....	45
5.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO	46

Preparación de la muestra.....	46
Lisis celular.....	46
Determinación de la concentración de proteína	47
Marcaje de células con SILAC.....	47
Marcaje de células con ITRAQ	50
Análisis de péptidos por Espectrometría de masas	51
Identificación de las proteínas	52
VI. RESULTADOS.....	53
6.1. ESTABLECIMIENTO Y ESTANDARIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL DENV2 EN CÉLULAS Huh7	53
Infección en células Huh 7.....	55
Determinación de la expresión diferencial de proteínas en células huh7 infectadas con DENV2 mediante el uso de SILAC.....	58
Determinación de la expresión diferencial de proteínas en células huh7 infectadas con DENV2 mediante el uso de ITRAQ.....	64
VII. DISCUSIÓN.....	73
VIII. CONCLUSIONES.....	82
IX. PERSPECTIVAS.....	83
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

RESUMEN

El dengue es una enfermedad aguda de etiología viral, de carácter endémico-epidémico, que es transmitida al hombre por mosquitos del género *Aedes*.

La infección en el humano con el virus del dengue (DENV) desencadena diversas manifestaciones clínicas, que van desde infecciones asintomáticas, una fiebre indiferenciada o fiebre por dengue y las formas graves de la enfermedad, conocidas como fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue. La FHD está asociada con hepatomegalia, ictericia y aumento del nivel de transaminasas, lo que sugiere la participación del hígado en la enfermedad.

El genoma del DENV codifica sólo para diez proteínas, con las cuales el virus debe modular la maquinaria celular del hospedero para completar su ciclo infeccioso. A pesar de la importancia de la enfermedad, aún se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en su patogénesis.

El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión diferencial de proteínas en células Huh 7 (células hepáticas humanas) tras la infección con el virus dengue. El análisis proteómico de las células Huh7 infectadas con el DENV2 se realizó por medio del marcaje con iTRAQ para la cuantificación de proteínas, seguida de la identificación de las mismas por espectrometría de masas tipo LC-MS/MS.

Se identificaron 11 proteínas que cambian de expresión en la célula infectada en comparación al control. Las proteínas que aumentan su expresión son: proteína Piwi-like 3, Apolipoproteína O, Vimentina, proteína ribosomal S19, proteína de unión a Oxysterol, proteína ribosomal L7, PX domain-containing protein kinase-like protein y sulfatasa extracelular; y las proteínas que disminuyeron su expresión son: proteína transmembranal 52, la aconitasa mitocondrial, y el canal de cationes.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL DENGUE

El dengue es una enfermedad infecciosa sistémica y dinámica, causada por el virus del dengue (DENV). Anualmente, la Organización Mundial de la Salud reporta entre 50 y 100 millones de casos, 500,000 hospitalizaciones por dengue hemorrágico y 24,000 muertes (WHO, 2012).

El DENV representa el mayor patógeno arboviral en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, principalmente en las zonas urbanas y semi-urbanas, donde aproximadamente el 40% de la población mundial vive en riesgo de ser infectada. Existen cuatro diferentes serotipos (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4) que son transmitidos al hombre mediante la picadura de los mosquitos del género *Aedes*.

El dengue constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, debido a su rápida diseminación dependiente de vectores artrópodos y a su impacto económico en los sistemas de salud, y en el individuo (Gubler, 2011; Suaya *et al.*, 2009).

EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Los primeros reportes de la fiebre dengue datan del SXVIII. Durante mucho tiempo, se pensó que el dengue era una enfermedad leve y no mortal, que afectaba a las personas que visitaban las áreas tropicales. Sin embargo, después de la Segunda Guerra Mundial comenzó una epidemia de dengue en el Sureste Asiático que desde entonces se ha propagado por el resto del mundo (Vasilakis y Weaver 2008). Se estima que dos quintas partes de la población mundial (3,600 millones de personas) vive en riesgo de ser infectada con el virus dengue (Gubler, 2011).

En los últimos años la incidencia de dengue ha aumentado a nivel mundial. Antes de 1970, solo nueve países habían sufrido epidemias de dengue. Sin embargo, ahora la enfermedad es endémica en 124 países de las regiones de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (Gubler, 2011) (Figura 1.1). En el continente americano, debido a un esfuerzo por prevenir la fiebre amarilla, enfermedad viral que también es transmitida por el mosquito *A. Aegypti*, prácticamente se erradicó este vector entre los años 1950 y 1960. Sin embargo, los programas de erradicación se descontinuaron, el mosquito comenzó a re-infestar los diferentes países y en consecuencia esta virosis se extendió por los países de la región (Figura 1.2). La primera epidemia de dengue en el continente americano se reportó en Cuba en 1981 (Guzman y Kouri, 2003) y desde entonces se han reportado diferentes epidemias en distintos países, siendo una de las más recientes la de Brasil en el 2010 en donde se reportaron 974,756 casos (Siqueiro *et al.*, 2011). En México, durante el 2012 el CENAVECE reportó 50,368 casos de los cuales 32, 662 son casos de FD, 17,706 son casos de FHD y 64 muertes (CENAVECE, 2012).

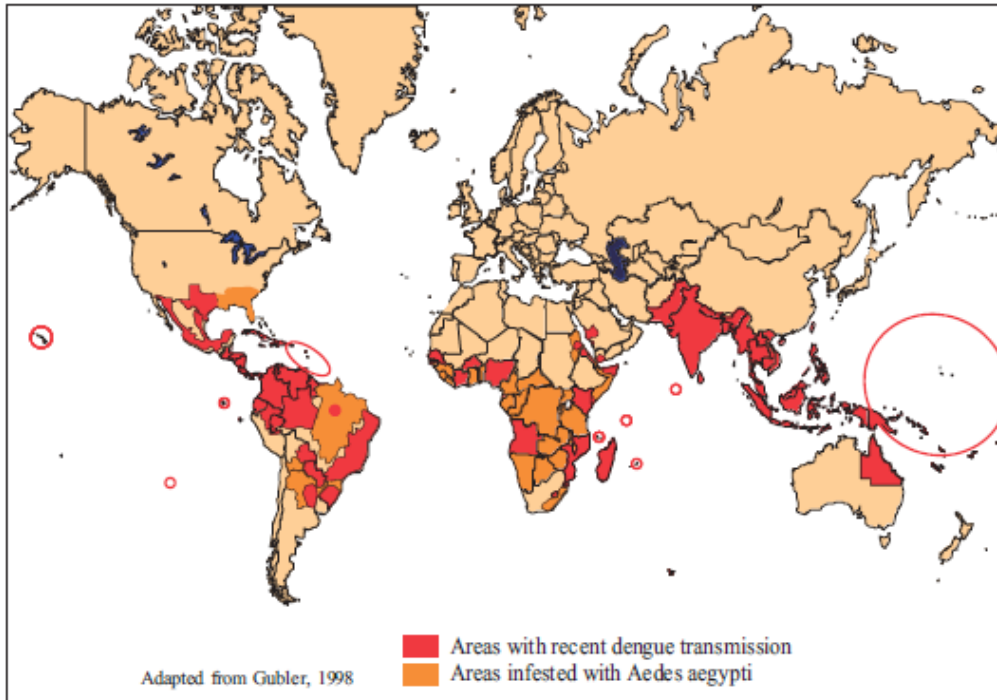


Figura 1.1 Distribución global del Dengue y el principal vector el mosquito *A.aegypti*. en rojo se muestran las áreas con transmisiones recientes del virus del dengue, en naranja las áreas con la presencia reportada del mosquito vector *Aedes aegypti*. Tomada de Gubler, 2011

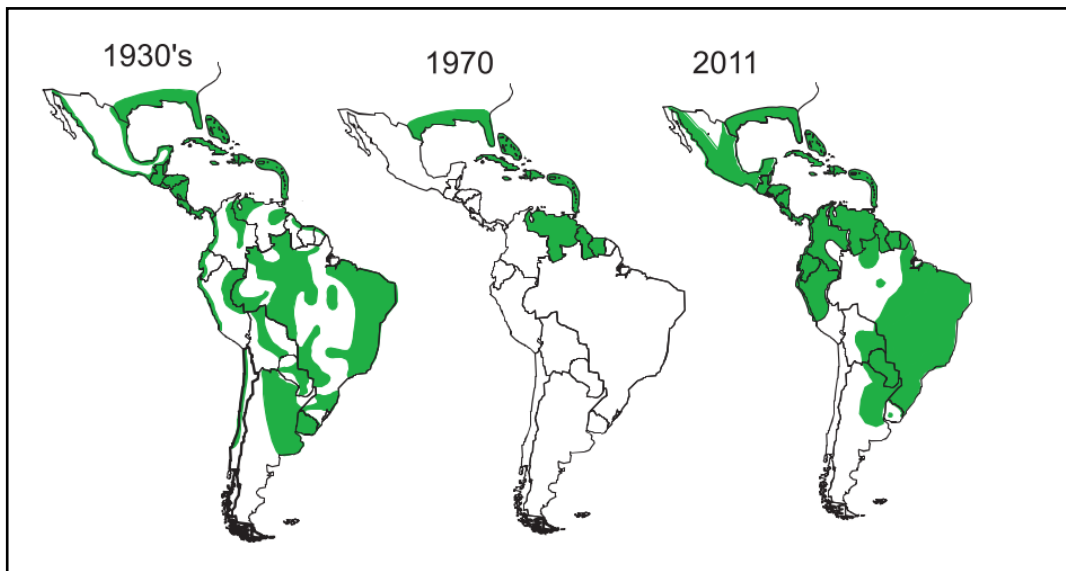


Figura 1.2. Distribucion del vector del dengue. En la decada de los 70 disminuyó considerablemente la presencia del mosquito *A. aegypti* en las areas tropicales de america. Sin embargo, se descontinuo el programa de erradicacion y el mosquito reinfestó el continente americano. Tomada de Gubler 2011

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

La infección del hombre con el DENV puede cursar en forma asintomática o expresarse en un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde infecciones asintomáticas, fiebre por dengue, llamado también dengue clásico (FD), fiebre hemorrágica por dengue (FHD), hasta síndrome de choque por Dengue (SCD).

La fiebre por dengue es una enfermedad autolimitada, con un período de incubación de 2 a 7 días. La fiebre tiene un comienzo abrupto, puede estar acompañada de escalofríos, cefalea supraorbital intensa, dolor retroocular, malestar general, náuseas, vómitos, linfadenopatías, anorexia y sensación de frío corporal. Estos síntomas aparecen acompañados de leucopenia y diferentes grados de trombocitopenia, en algunos casos, hemorragias menores como petequias, epistaxis y gingivorragia. Su pronóstico es en general benigno, su convalecencia puede acompañarse de fatiga prolongada durante varios días (Guzmán *et al.*, 2003).

Según la OMS, la FHD se caracteriza por fiebre, algún síntoma de sangrado (al menos una prueba de torniquete positiva), trombocitopenia de menos de 100 000 plaquetas/mm³ y un aumento del hematocrito en 20% o más y algún signo clínico de extravasación de líquidos, como derrame pleural y ascitis (PAHO, 1994). En pacientes con FHD cada vez se detectan con mayor frecuencia las llamadas manifestaciones inusuales como el fallo hepático, la miocardiopatía y los trastornos neurológicos en los que se incluyen la irritabilidad, la depresión y la encefalitis (Solomon *et al.*, 2000). Cuando estos signos se asocian con la disminución del volumen sanguíneo resulta en SCD de tipo hipovolémico que puede llevar a los pacientes a un estado de coma y

muerte (Martina *et al.*, 2009). Es importante resaltar que las infecciones asintomáticas representan aproximadamente un 60% del total de infecciones, lo que limita las medidas de control de la enfermedad (Gubler, 2006). Adicionalmente, no existe una vacuna profiláctica aprobada, ni un medicamento específico para tratar esta enfermedad. La base del tratamiento es la terapia de apoyo.

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL DENGUE

El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, es un virus envuelto de 40-50 nm de diámetro que presenta estructura icosaédrica (Figura 1.3). Su genoma está compuesto por ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 10 Kb; en el extremo 5' tiene Cap de tipo I y una región no traducida de alrededor de 100 bases, después de la cual se encuentra un marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales. La región 3' no traducida consta de aproximadamente 500 bases y no presenta una cadena poli A (Clyde *et al.*, 2006). Su proteoma está conformado por tres proteínas estructurales que son: la proteína de la cápside (C), premembrana (prM) y envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5). (Figura 1.4).

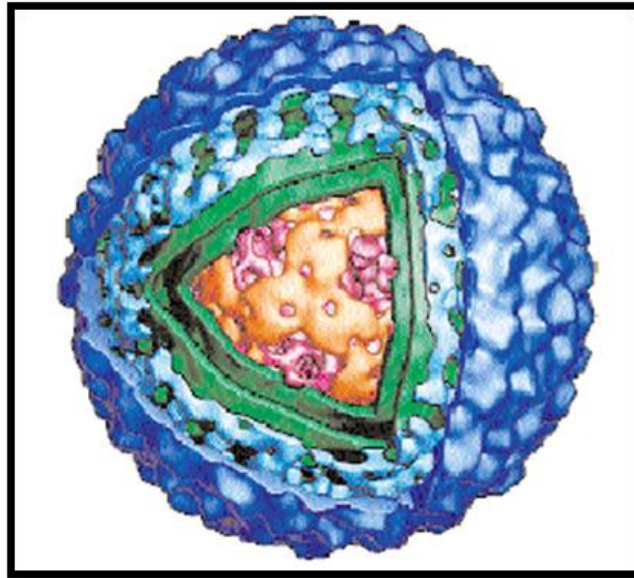


Figura 1.3. Estructura del virus del dengue. La figura esquematiza la estructura de la partícula viral, la proteína de envoltura E se muestra en azul, la proteína M en verde y la proteína C en naranja unida al genoma viral de ARN en rosa.

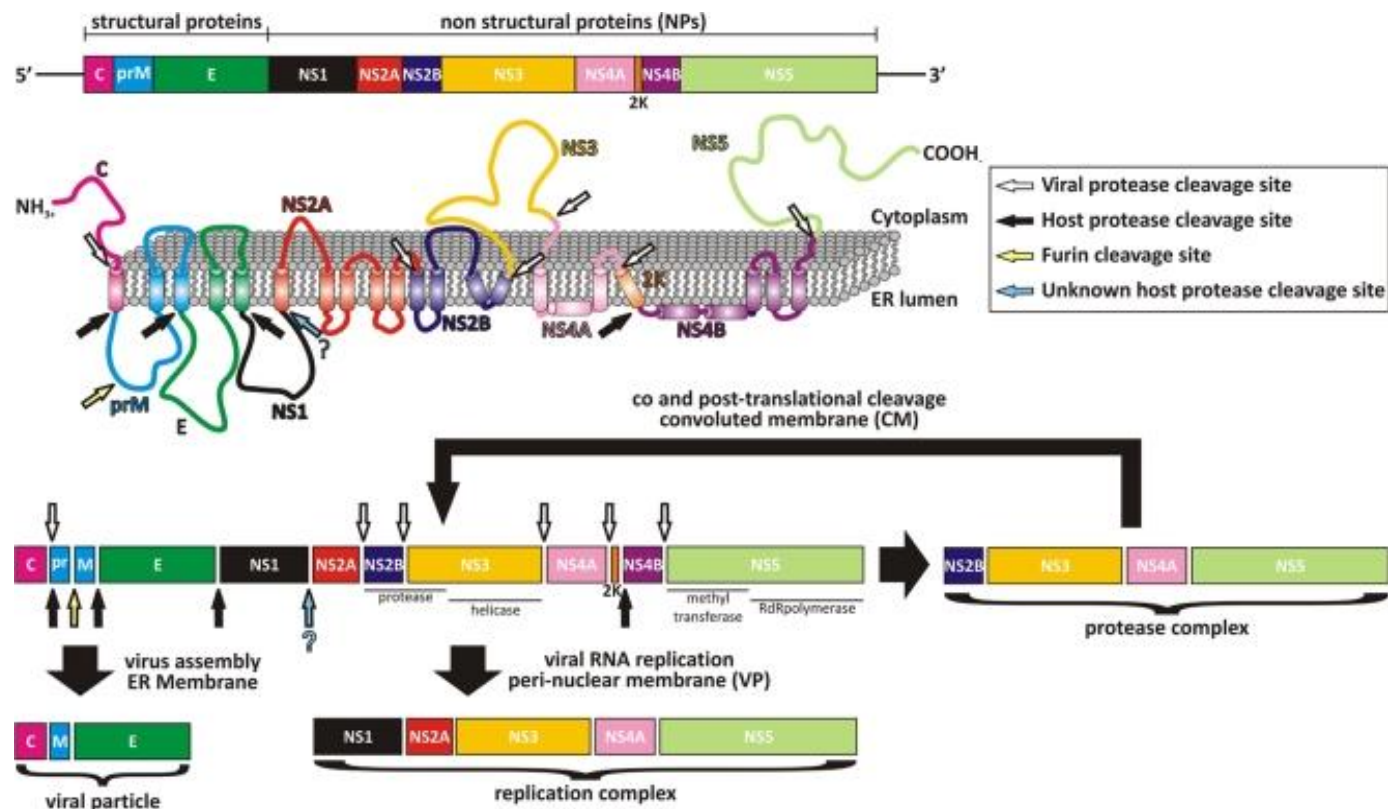


Figura 1.4. Diagrama de la organización y procesamiento de la poliproteína del virus del Dengue. En la parte superior se observa la organización lineal de las proteínas estructurales y no estructurales. En la parte media la topología de poliproteína en la membrana predicha por análisis bioquímicos y celulares, la cual es procesada por proteasas celulares y virales indicado por las flechas. La parte inferior muestra diferentes complejos proteicos que se presentan en diferentes compartimentos celulares durante y después del procesamiento de la poliproteína. Tomada de Assenberg *et al.*, 2009.

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

Proteína C.- Está asociada al ARN viral, tiene un peso molecular de aproximadamente 14 kDa, es altamente básica consistente con su participación en la formación de complejos ribonucleoprotéicos con el ARN genómico empaquetado. Los residuos básicos se concentran en los extremos amino y carboxilo terminal, lo que probablemente actúa cooperativamente para unir al ARN. En la porción central contiene un dominio hidrofóbico que interactúa con las membranas celulares y puede participar en el ensamblado del virion. La proteína C naciente contiene un dominio hidrofóbico en el carboxilo terminal, el cual actúa como una secuencia señal para la translocación de prM en el lumen del retículo endoplásmico (RE). La proteína C madura se genera por el corte de la proteasa serínica viral en un sitio arriba de su dominio hidrofóbico (Lixin *et al.*, 2004).

Proteína M.- La región amino terminal de prM es generado en el RE por una peptidasa señal del hospedero. Durante el ingreso del virion a la ruta secretoria prM es cortado por una furina residente de trans Golgi, para dar lugar a la proteína estructural M y el segmento “pr” que es predominantemente hidrofílico y contiene uno a tres sitios de glicosilación así como seis residuos de cisteína conservados que participan en la formación de puentes disulfuro. La proteína estructural M localizada en el carboxilo terminal de prM está presente en los viriones maduros y contiene un ectodominio corto, de cerca de 41 aminoácidos, seguido por dos dominios transmembranales (Kuhn *et al.*, 2002)

Proteína E.- Es una proteína de aproximadamente 50 kD, contiene dominios transmembranales adyacentes en el carboxilo terminal que funciona tanto como anclaje de la proteína a la membrana y como secuencia señal para la translocación de NS1. La proteína E contiene 12 residuos de cisteína altamente conservados que forman puentes disulfuro intramoleculares. Se divide en tres dominios estructurales y forma homodímeros paralelos que se asocian en la superficie del virión formando una red. Las regiones estructurales del ectodominio contienen probables sitios de unión a receptor, un péptido de fusión, el sitio de contacto para la formación de homodímeros y una región involucrada en la interacción prM-E. Cada monómero se asocia con dos proteínas E adyacentes para formar complejos triméricos. Los trímeros se extienden en la superficie externa del virion exponiendo sus péptidos de fusión (Perera *et al.*, 2008).

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NS)

Proteína NS1.- La glicoproteína NS1 de aproximadamente 48 kDa se encuentra asociada a membranas, libre en el citoplasma o como formas extracelulares. Funciona como cofactor para la replicación viral (Lindenbach y Rice, 1999). Es sintetizada en una célula infectada como un monómero soluble, que rápidamente dimeriza después de modificaciones postraduccionales en el lumen del RE, con su subsecuente transporte a la superficie de la célula y liberación en el medio extracelular (Winkler *et al.*, 1989). En solución, la NS1 secretada se asocia en hexámeros y se acumula en el suero (Flamand *et al.*, 1999). Se ha propuesto que facilita la formación de complejos inmunes (Avirutnan *et al.*, 2006), auto-anticuerpos que reaccionan con plaquetas y proteínas de matriz

extracelular (Falconar, 1997), causa daño a las células del endotelio (Lin *et al.*, 2003), e incrementa la infección viral (Alcon-LePoder *et al.*, 2005).

Proteína NS2.- Esta constituida por dos subunidades, NS2A y NS2B. NS2A se localiza en los sitios de replicación de ARN y NS2B es requerida para el complejo NS2B-NS3 que exhiben actividad de proteasa.

Proteína NS3.- Es cofactor de NS2B y NS5, tiene varios dominios catalíticos incluyendo uno de proteasa serínica, NS3 también tiene funciones nucleósido trifosfatasa y helicasa requeridas para la síntesis del ARN viral, así como la actividad 5´trifosfatasa requerida para el capping. Interactúa con proteínas de unión a receptores nucleares humanos, las cuales regulan el tráfico intracelular entre el ER y Golgi (Perera *et al.*, 2008).

Proteína NS4. Esta proteína es procesada en el RE, y resulta en las proteínas NS4A y NS4B, que son proteínas hidrofóbicas, de alrededor de 16 y 27 kD respectivamente, las cuales están asociadas a membrana. NS4A se asocia con los complejos de replicación y promueve el rearrreglo de membranas induciendo la curvatura del RE (Miller *et al.*, 2007). Además colocaliza con el ARN de doble cadena, interacciona con NS1 para que la síntesis de ARN viral sea más eficiente (Jiang *et al.*, 2009). NS4B participa en la modulación de la respuesta a interferón (Muñoz-Jordán 2003)

Proteína NS5.- Es la ARN polimerasa dependiente de ARN y tiene actividad de metiltransferasa, otra enzima esencial en la vía de capping (Zhou *et al.*, 2007).

CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS DENGUE

El ciclo de replicación del virus del dengue se esquematiza en la figura 1.5 y se describe a continuación:

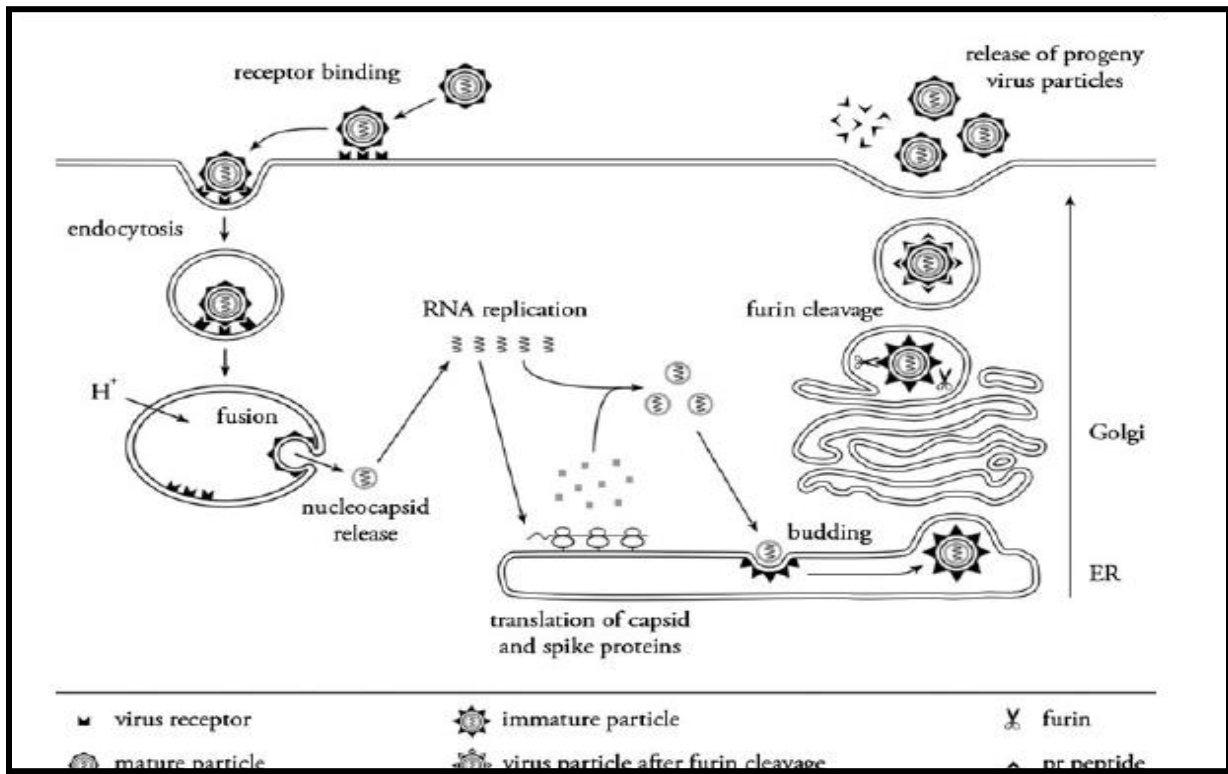


Figura 1.5. Ciclo de replicación del virus Del dengue. Los viriones se unen a la superficie de la célula huésped, posteriormente entran en la célula por endocitosis mediada por receptor. La acidificación de la vesícula endosomal ocasiona cambios conformacionales en el virion lo que provoca la fusión de las membranas viral y celular para liberar el genoma en el citoplasma. El ARN de sentido positivo es traducido en una única poliproteína posteriormente procesada por proteasas tanto virales como del huésped, la replicación del genoma ocurre en complejos membranosos derivados del RE. Una vez producidas las proteínas estructurales y el ARN viral ocurre el ensamblaje del virus. Las partículas virales inmaduras son transportadas a través de la red trans-Golgi en donde son escindidas por una furina del huésped lo que resulta en partículas maduras e infecciosas las cuales son liberadas posteriormente por exocitosis. Tomada de Rodenhuis *et al.*, 2010.

El primer paso en la infección por DENV es la unión del virus a los receptores celulares en la superficie de la célula diana. El tropismo celular del virus dengue es amplio, está adaptado a desarrollarse en dos hospederos filogenéticamente diferentes, el hombre y los mosquitos del género *Aedes*. El blanco principal de la infección de DENV en humanos son las células dendríticas, los monocitos y los macrófagos (Marovich *et al.*, 2001), además de células de hígado, pulmón, nódulos linfáticos, timo, cerebro y piel (Wu *et al.*, 2000; Thepparit *et al.*, 2004; Diamond *et al.*, 2000). El amplio rango de células permisivas a la infección sugiere que el virus puede unirse a una molécula ubicua de superficie o aprovechar múltiples receptores para mediar la infección. En el caso de las células de mamíferos, las moléculas candidatos a receptores pueden ser clasificadas en 3 grupos:

- Carbohidratos: como glucosaminoglicanos sulfatados y glicoesfingolípidos, se cree que actúan como moléculas correceptoras, las cuales aumentan la eficiencia de la entrada del virus. Por ejemplo, el heparan sulfato es indispensable para la entrada del virus a las células hepáticas (Chen *et al.*, 1997)
- Proteínas de unión a carbohidratos llamadas lectinas expresadas en células dendríticas y macrófagos, las cuales son las primeras que entran en contacto con el DENV introducido por la picadura de mosquito. Entre estas lectinas se encuentra DC SIGN la cual es la interacción mejor caracterizada, se une directamente a los N-glicanos de la proteína E expresada en la partícula viral (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003). El receptor de manosa que también contribuye a la entrada del DENV en macrófagos (Miller *et al.*, 2008). El uso de lectinas por DENV en la

entrada viral sugiere que eventos de reconocimiento de carbohidratos permiten la propagación del DENV en el humano.

- Factores relacionados al plegamiento de proteínas, como proteínas de choque térmico (Reyes del Valle *et al.*, 2005) y chaperonas que han sido reportadas solo para el serotipo 2 y 4.
- Otras proteínas como el receptor de alta afinidad a laminina (Tio *et al.*, 2005), proteína asociada a CD14 (Chen *et al.*, 1999) y otras proteínas no caracterizadas (Ramos Castañeda *et al.*, 1997).

En células de mosquito se ha observado que DENV interactúa con Hsp70, R80, R67, y una proteína de 45-kDa (Yazi Mendoza *et al.*, 2002). Receptor de laminina (Sakoonwatanyoo *et al.*, 2006), prohibitina (Kuadkitkan *et al.*, 2010) y tubulina (Chee *et al.*, 2004).

En la mayoría de células el DENV ingresa por endocitosis mediada por clatrina, aunque puede utilizar vías alternas de internalización, como aquellas independientes de clatrina, caveolas y balsas lipídicas (Acosta *et al.*, 2009). Una vez dentro del endosoma, la estructura del virion cambia radicalmente cuando el pH disminuye. Los dímeros de proteína E cambian a una estructura trimérica, exponiendo el péptido de fusión, lo que permite que interactúe con la membrana endosomal e inestabiliza la envoltura viral para favorecer la fusión entre estas dos membranas, eventualmente esta fusión libera el genoma viral (Perera *et al.*, 2008).

Debido a que el ARN viral puede actuar como ARNm, el genoma del DENV liberado en el citoplasma se asocia al RE rugoso en donde se traduce. Durante la traducción viral

se producen varios cambios en las células huésped, uno de esos cambios parece ser común en los virus de ARN y es la inducción de estructuras de membrana, cambio que proporciona un microambiente limitado por membrana necesario para la síntesis del genoma viral y la morfogénesis viral. Una vez que el ARN viral ha reclutado la maquinaria de traducción, la transición del inicio de traducción a la elongación ocurre cuando la subunidad pequeña del ribosoma se localiza en el codón de inicio. La replicación de muchos virus de ARN de cadena positiva está íntimamente ligada a las membranas que envuelven a los complejos de replicación activa (CR). La replicación viral se produce en dos etapas, primero el ARN de polaridad positiva es copiado a un ARN de polaridad negativa, que a su vez, sirve de molde para la síntesis de múltiples hebras de ARN de polaridad positiva. Como la cadena positiva sirve tanto de genoma como de ARNm, esta es producida en mayor cantidad que la cadena negativa (Clyde *et al.*, 2006). El genoma viral sintetizado es empacado en la nucleocapside formada por la proteína C. Las proteínas prM y E forman heterodímeros asociados en trímeros y estas interacciones oligoméricas inducen a una superficie curvada. Según indican los análisis estructurales un solo virion inmaduro contiene 180 heterodímeros prM/E que se proyectan verticalmente fuera de la superficie viral como 60 espículas trimétricos (Perera *et al.*, 2008). Por último, las partículas inmaduras del virus atraviesan las vesículas en el aparato de Golgi, donde la proteína E sufre glicosilaciones. En el último paso en la morfogénesis viral, una furina convierte prM en M para generar viriones maduros, esto cambia la conformación de las proteínas E, las cuales forman 90 homodímeros y dan a la superficie del virion un aspecto liso (Rodenhuis *et al.*, 2010). La liberación del virus ocurre por fusión de las membranas de la vesícula exocítica con la membrana plasmática.

PATOGÉNESIS DEL DENGUE

Diversos factores han sido involucrados en la patogenia de la fiebre dengue, de estos resaltan: la virulencia de la cepa viral (Leitmeyer *et al*, 1999), una respuesta inmune amplificada debido a infecciones secuenciales y una respuesta inflamatoria exacerbada (Whitehead *et al.*, 2007).

La infección del hombre por DENV induce la activación de mecanismos innatos de respuesta inmune, principalmente la respuesta de interferon α/β . Estas moléculas se detectan en pacientes infectados con dengue, y en niños infectados perdura por largos periodos de tiempo aún después de la recuperación (Gagnon *et al.*, 2002). También, se conoce que el virus inhibe la señalización celular inducida por IFN α/β mediante sus proteínas NS2A, NS4A, NS4B y NS5 (Muñoz-Jordan *et al*; 2003, 2005; Jones *et al*; 2005) y así evita la respuesta antiviral en la célula huésped. No se conoce con precisión los eventos moleculares que conllevan a un desequilibrio de estas dos fuerzas, inducción-modulación que puede llevar a las formas graves de la enfermedad.

La infección con un serotipo del DENV induce en el hombre la producción de anticuerpos IgM específicos contra el virus, que se detectan a partir del quinto día del inicio de la fiebre. Algunos de estos anticuerpos tienen propiedades neutralizantes, por lo cual confieren al individuo inmunidad a largo plazo contra el mismo serotipo viral, pero no los protege contra infecciones de los otros 3 serotipos, sólo produce una inmunidad parcial de corta duración (Stephenson, *et al* 2005; Tan y Alonso, 2009).

Datos epidemiológicos sugieren que la FHD, se presenta con mayor frecuencia (90%)

en pacientes que cursan por una segunda infección causada por un serotipo diferente al que ocasionó la infección primaria (Mathew *et al.* 2008). También, se ha visto que es más frecuente en niños menores de un año hijos de madres con antecedentes de infección de DENV de diferente serotipo (Kliks *et al.*, 1988). Estas observaciones sugieren la participación del sistema inmune, particularmente de anticuerpos con reactividad cruzada entre serotipos sin capacidad neutralizante para el nuevo serotipo, pero con capacidad opsónica que potencia dramáticamente la infección de células del linaje monocítico a través de endocitosis mediada por receptores Fc. Este fenómeno se denomina infección facilitada por anticuerpos (Halstead, 1988). Sin embargo, también se han reportado casos severos de dengue durante una infección primaria (Kalayanarooj *et al.*, 2003; Kliks *et al.*, 1988). El control de la infección primaria, así como la inmunidad ante una infección secundaria son dadas por la inmunidad adaptativa, mediada por linfocitos B productores de anticuerpos, y con la ayuda de los linfocitos T. Los linfocitos T CD8+ parecen tener un papel importante en la eliminación de células infectadas por DENV en las fases tardías de la infección primaria y durante la re-infección (Whitehead *et al.*, 2007). También, se ha sugerido que la infección de las células con el virus dengue, produce la activación de linfocitos T no protectores ocasionando una “tormenta” de citocinas y otros mediadores inflamatorios; serían estos los responsables de la fuga de plasma característica asociada con las formas severas del dengue DHF/SCD (Martina *et al.*, 2009).

1.2. PROTEÓMICA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS: UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN VIRUS-HOSPEDERO

Una de las preguntas claves en virología es conocer como los virus, quienes codifican un número limitado de proteínas pueden controlar/modular de manera temporal o constante la maquinaria celular de su hospedero. Para entender la patogenicidad del virus dengue u de otro virus, es importante conocer la función de cada proteína viral en la célula hospedero, la dinámica natural de estas proteínas, esto es modificaciones post-traduccionales, cortes enzimáticos, activación o destrucción por proteólisis, las interacciones entre las proteínas virales-proteínas celulares, y la consecuencia de estas interacciones en las vías de señalización celular. Recientemente la emergencia de tecnologías a escala global, particularmente la proteómica basada en espectrometría de masas han permitido el análisis de los proteomas virales y celulares, que se han utilizado para definir las interacciones entre el virus y su célula hospedera (Thomas *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2011; Munday *et al.*, 2012).

La investigación proteómica, involucra diferentes métodos bioquímicos para el análisis y separación de proteínas, seguida por su identificación y cuantificación por espectrometría de masas.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

Es una técnica analítica que permite medir con precisión la relación masa/carga (m/z) de una molécula. El primer espectrómetro de masas fue utilizado por Thomson para medir masas atómicas. El principio del MS es generar iones en el estado gaseoso, que son transportados y separados a través de campos magnéticos o eléctricos en el analizador de acuerdo a su relación m/z . Se usa para la determinación de la masa molecular de moléculas, y en los últimos 25 años para la identificación de polímeros, las proteínas, ácidos nucleicos, azúcares, etc. (Van Riper *et al.*, 2013). Los componentes principales de un espectrómetro de masas son tres (Figura 1.6) :

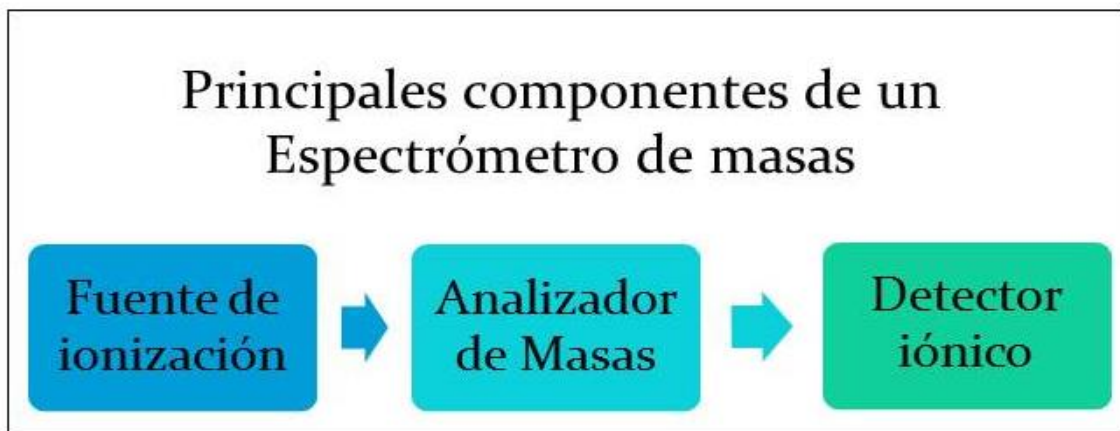


Figura 1.6. Principales componentes de un espectrómetro de masas. Un espectrómetro de masas cuenta con una fuente de ionización que en el caso de análisis de péptidos puede ser *electrospray* o *MALDI*, un analizador de masas que separa los péptidos ionizados de acuerdo a su relación m/z , selecciona los iones para su fragmentación y determina los valores de m/z de los iones precursores y productos de la fragmentación, por ultimo un detector iónico que convierte la energía de las partículas que ingresan en una señal de corriente eléctrica que es registrada por los dispositivos electrónicos.

1) **Fuente de ionización**, como el análisis de masas utiliza campos electromagnéticos sobre partículas cargadas en el vacío, las moléculas primero deben ser cargadas eléctricamente y transferidas a fase gaseosa. La ionización molecular puede ser realizada a través de diferentes métodos de ionización, sin embargo, para la ionización de proteínas y péptidos las más utilizadas son las ionizaciones por ESI (Electrospray Ionization) y por MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization).

a. Ionización por electrospray (ESI), se produce al aplicar un campo eléctrico fuerte a un líquido que pasa a través de un tubo capilar. El campo eléctrico se obtiene al aplicar una diferencia de potencial de 6.3 kV. Este campo induce una acumulación de carga en la superficie del líquido situado en el extremo del capilar, que se rompe para formar gotitas altamente cargadas. El gas inyectado coaxialmente, con un bajo caudal permite la dispersión del spray al ser limitado en el espacio. Estas gotitas a continuación, pasan a través de una cortina de gas inerte caliente o a través de un capilar caliente para eliminar las moléculas del disolvente. Si se examina con un microscopio se observa la formación de la gota naciente en la punta del capilar mientras aumenta el voltaje, a bajos voltajes la gota parece esférica. A continuación, la gota se alarga bajo la presión de las cargas acumuladas en la punta y debido al campo eléctrico, cuando la tensión superficial se rompe, la forma de la gota cambia para formar un cono conocido como cono de Taylor, y el spray aparece. El disolvente se evapora, las gotas se hacen más pequeñas y su carga por unidad de volumen se incrementa. Bajo la influencia del campo eléctrico, ocurre la deformación de la gota. La gota se alarga en virtud de la fuerza resultante de la acumulación de carga, de manera

similar a lo que ocurrió en la punta del capilar, finalmente se produce un nuevo cono de Taylor. A partir de este cono de Taylor, alrededor de 20 gotas más pequeñas son liberadas. Normalmente, una gota de la primera generación del capilar tiene un diámetro de alrededor de 1,5 micras y se llevan alrededor de 50,000 cargas elementales. Las gotas descendientes tienen un diámetro de 0,1 micras y se llevan 300 a 400 cargas elementales. El volumen total de las gotas descendientes es de aproximadamente 2% de la gota precursor, pero contienen 15% de la carga. Estas pequeñas gotitas altamente cargadas seguirán perdiendo solvente, y cuando el campo eléctrico en su superficie se vuelve lo suficientemente grande, llegan al límite de Rayleigh y ocurre la explosión Coulomb, originando iones cargados en estado gaseoso (Wilm 2011).

- b. Ionización MALDI, como su nombre lo dice es una ionización auxiliada por matrices, éstas son moléculas orgánicas de bajo peso molecular derivadas de ácidos aromáticos que absorben la luz en longitudes de onda específicas, por lo general en la zona UV. Para la preparación de la muestra la matriz se disuelve en un solvente orgánico en condiciones ácidas y se mezcla con los péptidos que serán analizados. Una pequeña gota se coloca en una placa de muestra, el disolvente orgánico se deja evaporar, durante la evaporación la matriz forma cristales y los componentes de la muestra se incorporan a estos cristales. Un láser incide sobre los cristales en pulsos cortos y es absorbido por la matriz. En esta etapa la matriz cumple con dos funciones: absorbe la luz del láser y se ioniza, mientras que al mismo tiempo protege la estructura molecular de analito de la energía perjudicial transferida por la luz del láser. La energía absorbida

hace que las moléculas de la matriz y de la muestra se sublimen. La mayoría de los péptidos ionizados son aductos formados por un solo protón aducto, por lo tanto los iones de los péptidos en general tienen carga 1+ (Afonso *et al.*, 2005).

2) **Analizador de masas**, tienen la función de separar los péptidos ionizados de acuerdo a su relación m/z . Seleccionar los iones dentro de un rango adecuado de m/z para la posterior fragmentación. Fragmentar el ion precursor seleccionado. Determinar los valores de m/z de iones precursores y resultantes de la fragmentación. A continuación se describen los analizadores más utilizados, clasificados de acuerdo a su funcionamiento. Los diferentes tipos de analizadores también se pueden combinar en los llamados analizadores híbridos, para maximizar las propiedades benéficas de cada uno.

a. Tiempo de vuelo-TOF (del inglés time of flight), estos analizadores miden el tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente de ionización hasta el detector. Todos los iones reciben la misma energía cinética durante la aceleración instantánea, sin embargo, iones con diferentes m/z poseen diferentes velocidades. Los iones chocan en el detector de forma ascendente de valores m/z , eso es, los iones de baja m/z llegan al detector antes que aquellos con alta m/z debido a que entre mayor sea la m/z tendrán una velocidad menor (Vestal *et al.*, 2005).

b. Cuadrupolo, el analizador de masas de cuadrupolo consiste en cuatro barras metálicas paralelas. El campo eléctrico entre las barras se obtiene mediante la aplicación de una superposición de una corriente estática directa (DC) y una

radiofrecuencia (RF) de corriente alterna (AC). Los iones que pasan a través del campo seguirán una trayectoria en espiral. El radio de la espiral de un ion en particular depende del valor m/z del ion y el voltaje compensado para el campo. Para un voltaje específico, sólo los iones de una determinada m/z llegarán al detector, mientras que los otros serán expulsados del cuadrupolo o chocan con las barras. El valor de m/z de los iones que atraviesan el cuadrupolo puede calcularse a partir el voltaje aplicado para producir una determinada intensidad de campo electromagnético.

- c. Trampa de iones, Las trampas de iones, son equipos capaces de atrapar los iones en un espacio confinado. Los análisis MS y MS/MS son realizados en la misma unidad, por lo que es de tipo *on time*. La expulsión de los iones, tanto mezclas de iones precursores como mezclas de iones producidos por la fragmentación pueden mantenerse o ser removidos a través de la inestabilidad selectiva producida por una barradura de longitud de onda en la radiofrecuencia aplicada (Stafoord, 1994). Dado que los fragmentos de iones permanecen atrapados, es posible repetir el proceso de fragmentación, formando espectros MS^n . El aislamiento selectivo de iones con un determinado valor de m/z permite activar los métodos de fragmentación en tándem produciendo espectros del tipo MS^n .
- d. Orbitrap, este analizador consiste en un electrodo coaxial exterior y uno interior, que forman un campo electrostático. Los iones forman una oscilación armónica orbital a lo largo del eje del campo electrostático. La frecuencia de oscilación de una molécula es inversamente proporcional a su valor de m/z , por lo tanto los

valores m/z de las moléculas individuales puede calcularse por la ecuación de la transformada de Fourier. Los analizadores Orbitrap tienen una alta precisión, resolución y exactitud; el diseño está patentado por Thermo Scientific (Perry *et al.*, 2008)

- 3) **Detector iónico**, aunque existen diferentes tipos de detectores, como: el Vaso de Faraday, fotomultiplicador (o contador de centelleos), el más utilizado actualmente es el multiplicador de electrones. La función de este detector es convertir la energía de las partículas que ingresan en una señal de corriente que es registrada por los dispositivos electrónicos y se transfiere a la computadora del sistema de adquisición del espectrómetro de masas. Cuando una partícula entrante golpea el detector la energía del impacto causa una emisión de partículas secundarias. El número de partículas secundarias creadas por un impacto depende de la energía y/o la velocidad de los iones de entrada. Un detector de preferencia debe tener una alta eficiencia de conversión de la energía de los iones de entrada a electrones o fotones, una respuesta lineal, poco ruido, un tiempo de recuperación corto y mínimas variaciones en el tiempo de tránsito (Barnesiv y Hieftje, 2004).

FRAGMENTACIÓN EN TÁNDEM (MS/MS)

Para determinar la estructura primaria de péptidos y proteínas, estos son sometidos a disociación de la cadena polipeptídica, a través del aumento de la energía cinética de las partículas, por aplicación de campos electro-magnéticos controlados por voltaje y por la colisión de estos con un gas inerte como el helio o nitrógeno a baja presión. Este tipo de disociación es conocida como CID (Collision Induced Dissociation). El espectro resultante, llamado espectro de MS/MS (o fragmentación en tándem o MS²), es básicamente una lista de coeficientes de m/z de fragmentos con diferencias correspondientes a la masa específica de los diferentes aminoácidos. La conexión de los fragmentos con un aumento de tamaño del extremo N terminal (serie b) o del extremo C terminal (serie y) permite la secuenciación “de novo” de péptidos y proteínas. Existen diferentes tecnologías para fragmentar péptidos, los más utilizados son CID, HCD, PQD, ETD y ECD. (Guthals y Bandeira, 2012).

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para identificar una proteína de interés, se realiza una digestión proteolítica de ésta con tripsina, los péptidos generados son analizados en el espectrómetro de masas. La identificación se realiza al comparar las masas peptídicas experimentales, con las masas teóricas generadas *in silico* usando una base de datos particular. Existen diversos programas de análisis proteómico. Los motores de búsqueda más utilizados para la identificación de proteínas son MASCOT, SEQUEST, *Protein Prospector*, *Peaks Online*, *OMSSA*, *X! tándem* (Eidhammer *et al* 2007). Para la identificación de proteínas

por espectrometría de masas por lo general se utiliza como primer filtro los valores de la masa molecular de los péptidos generados por el corte enzimático, el segundo filtro es la comparación de los valores de m/z de los iones generados por MS/MS los cuales generan la secuencia de los péptidos. Los valores de *scores* en la identificación de proteínas es dependiente de la exactitud de las coincidencias del número de péptidos coincidentes y de la exactitud de esos valores finalmente del número de sitios teóricos de corte omitidos por la enzima.

PROTEÓMICA CUANTITATIVA

Para la biología de sistemas, la capacidad de cuantificar las proteínas es una ventaja clave del análisis proteómico. El objetivo general de estas mediciones es obtener una instantánea de las concentraciones de las proteínas asociadas a los diferentes estados fisiológicos. Las mediciones cuantitativas de las concentraciones de proteínas representan uno de los componentes clave hacia la construcción de una red funcional. Hay dos grandes grupos de métodos cuantitativos en proteómica basada en MS: los métodos libres de marcaje y los métodos que emplean el marcaje con isótopos estables, utilizando los enfoques de proteómica cuantitativa que requieren el marcaje con isótopos estables se pueden hacer análisis de expresión de proteínas tanto de manera absoluta como relativa. En la proteómica cuantitativa absoluta se sintetizan

péptidos de referencia con la misma secuencia que los péptidos nativos de interés, pero marcados con isótopos estables, durante la digestión son agregados en una concentración conocida al lisado celular, para ser utilizados como estándares internos. La concentración del péptido específico es determinada por la comparación de la señal entre la forma marcada y la forma nativa, sin marcaje. La proteómica cuantitativa relativa puede comparar dos o más muestras usando métodos de marcaje con isótopos estables (Yates *et al.*, 2009).

ITRAQ

Las etiquetas de ITRAQ consisten en un grupo reportero (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, Da), un grupo de equilibrio o balanceador y un grupo aminoreactivo que se une covalentemente a los péptidos generados por corte enzimático (Figura 1.8). El grupo de equilibrio confiere el mismo valor m/z a todas las etiquetas, siendo que péptidos generados de la misma proteína en diferentes condiciones de tratamiento tendrán la misma masa molecular, pero reporteros de masas moleculares diferentes. Como los péptidos generados en las 4 distintas condiciones tendrán las mismas propiedades físico-químicas e igual masa molecular, tendrán tiempos de retención iguales en el sistema de cromatografía líquida. Sin embargo, cuando el ion precursor que contiene las 4 diferentes etiquetas es detectado en el espectrómetro de masas y sometido a procesos de fragmentación en tándem como HCD (High energy Collision Dissociation), producirán la misma secuencia, pero reporteros diferentes, cuya abundancia de la

proteína bajo las diferentes condiciones puede ser determinada a través de la intensidad del pico del ion reportero correspondiente. (Walther *et al.*, 2010).

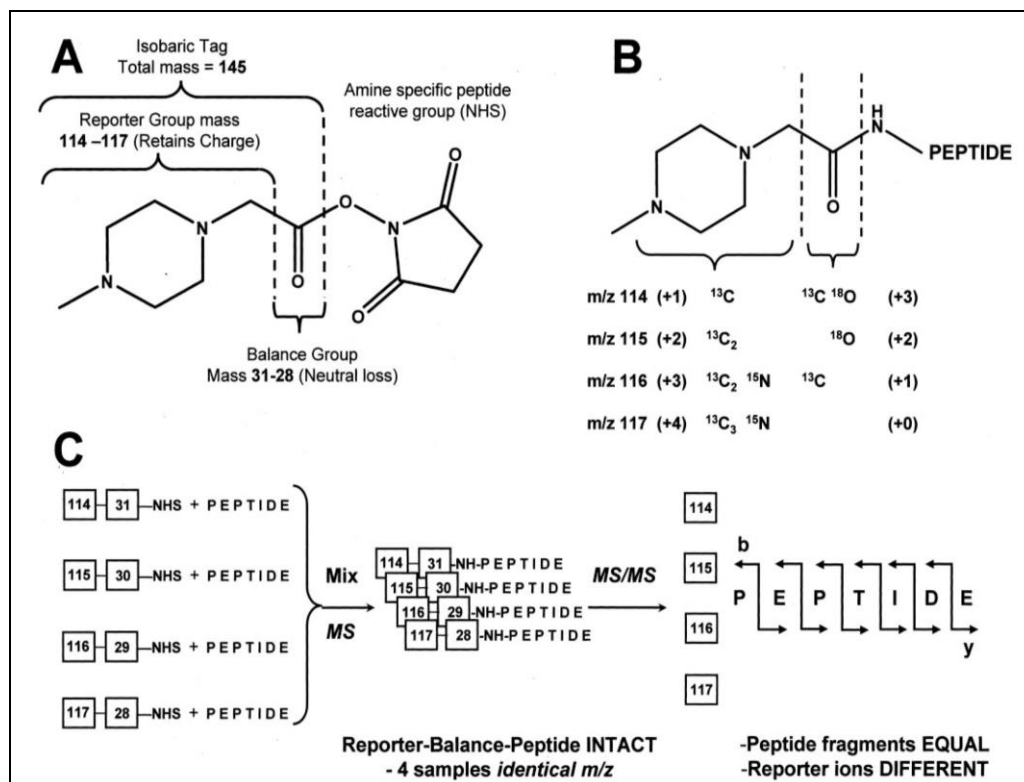


Figura 1.8 Esquema del marcaje ITRAQ. A. Composición química del reactivo. **B** Balance isotópico para cada marca. **C** combinaciones isobáricas para un mismo péptido. Tomado de Ross 2004.

SILAC

Marcaje de isotopos estables de aminoácidos en cultivo celular (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) es un método simple y directo para la incorporación in vivo de una etiqueta en las proteínas para su posterior análisis por espectrometría de masas. SILAC se basa en la incorporación metabólica de una determinada forma "ligera" o "pesada" de los aminoácidos en las proteínas. El método se basa en la incorporación de aminoácidos con isótopos pesados estables (deuterio, ^{13}C , ^{15}N). Así, en un experimento, dos poblaciones de células se cultivan en medios de cultivo que son idénticos, excepto que uno de ellos contiene la forma "ligera" y el otro la forma "pesada" de un aminoácido particular (por ejemplo L-lisina ^{12}C y ^{13}C , respectivamente). Cuando el análogo marcado de un aminoácido se suministra a las células en cultivo en lugar del aminoácido natural, se incorpora en todas las proteínas recién sintetizadas. Después de una serie de divisiones celulares, este aminoácido particular será reemplazado por su análogo con el isótopo marcado. Puesto que no hay casi ninguna diferencia química entre el aminoácido marcado y el aminoácido con los isotopos naturales, las células se comportan exactamente igual que la población celular cultivada en presencia del aminoácido normal. (Munday *et al.*, 2012).

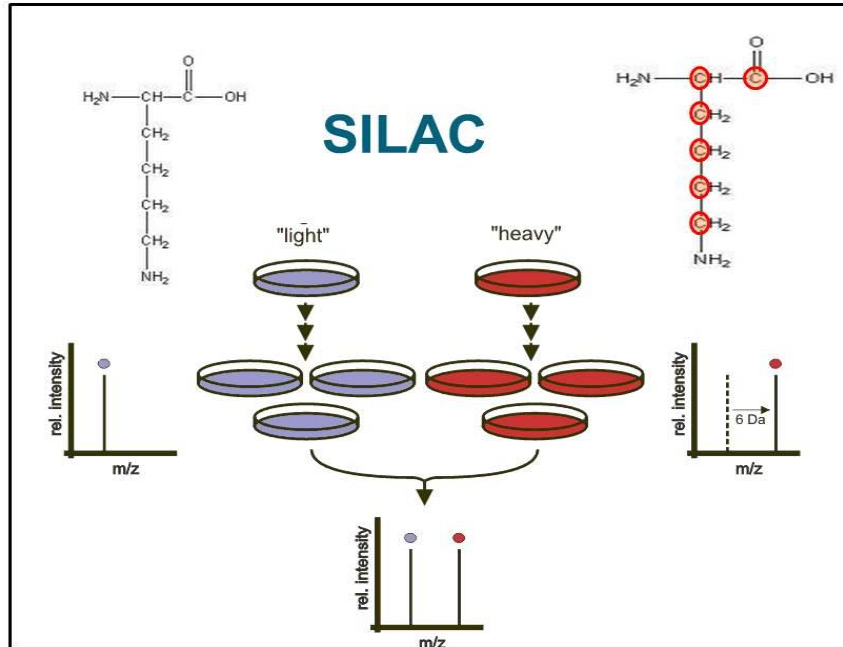


Figura 1.9. Marcaje por SILAC. En el marcaje SILAC una población celular es cultivada en un medio con lisina que sus seis carbonos son ^{13}C , a la que se le denomina lisina pesada, otra población celular crece en un medio con lisina que sus seis carbonos son ^{12}C , a la que se le denomina ligera, después de varios pases en estos medios la lisina se incorpora a las proteínas celulares, al analizar por espectrometría de masas los iones precursores de los péptidos que contienen lisina pesada aumentan 6 Da, en una mezcla de proteínas de ambas poblaciones celulares la cuantificación se logra comparando la intensidad de los iones precursores que tienen lisina ligera con la intensidad de los iones precursores que tienen la lisina pesada.

II. ANTECEDENTES

El tropismo celular y tisular del virus dengue parece ser el mayor determinante de su patogénesis. Así también, la ausencia de un modelo animal apropiado para el estudio de la patofisiología de la enfermedad dificulta en gran medida nuestra comprensión del papel desempeñado por el tropismo celular del virus. Los datos *in vitro* y los estudios post-mortem en humanos, sugieren que los sistemas que desempeñan un papel importante en la patogénesis de las formas severas del dengue son tres: el sistema inmunológico, el hígado, y las células endoteliales (Martina *et al.*, 2009).

Durante la alimentación hematófaga de los mosquitos hembras infectados, los humanos adquieren el virus dengue, el cual se inyecta presumiblemente en el torrente sanguíneo, con efectos colaterales en la epidermis y la dermis, lo que resulta en la infección de las células de Langerhans inmaduras (células dendríticas epidérmicas y queratinocitos (Limon-Flores *et al.*, 2005). Las células infectadas migran desde el sitio de la infección a los ganglios linfáticos, donde se reclutan monocitos y macrófagos que se convierten en los blancos principales de la infección. Por consiguiente, la infección se amplifica y el virus se disemina a través del sistema linfático. Como resultado de esta viremia primaria, varias células del linaje mononuclear, incluyendo monocitos derivados de la sangre (Durbin *et al.*, 2008), mieloides DC (Kwan *et al.*, 2005) y los macrófagos esplénicos y el hígado (Blackley *et al.*, 2007; Jessie *et al.*, 2004; Huerre *et al.*, 2001) están infectados. También se ha demostrado que el virus dengue presenta tropismo por las células mononucleares circulantes en la sangre y por las células que residen en el bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea de ratones infectados (Kyle *et al.*, 2007).

Por lo anterior, podemos decir que el tropismo celular del virus dengue en mamíferos es amplio, y que numerosos estudios han implicado al hígado como un sitio de replicación viral. Se han detectado antígenos de virus del dengue en los hepatocitos y se han recuperado partículas virales en muestras de biopsia de hígado de pacientes con DH (Hall *et al*, 1999). También se han detectado necrosis centrolobular, cambios grasos, hiperplasia de células de Kupffer, cuerpos acidófilos e infiltración de monocitos en el tracto en pacientes con DH/SCD. El mal funcionamiento del hígado puede presentarse por la infección directa de células del hígado con el virus del dengue o mediado por la respuesta inmune del huésped. El proceso inflamatorio, consecuencia de la infección por el virus del dengue, produce una lesión parenquimatosa que libera AST y ALT, enzimas hepáticas implicadas en el metabolismo de aminoácidos en la sangre. En la fase aguda de la enfermedad se produce un aumento de las transaminasas, que posteriormente disminuyen a medida de que el hígado se recupera (Larreal *et al*. 2005). Todo ello, ha llevado a que se busque un modelo de infección del virus dengue en hepatocitos. Se ha estudiado la infección de DENV en 4 líneas celulares provenientes de hepatomas (HA22T, Huh 7, Hep3B, y PLC) (Lin *et al*, 2000) y una línea de hepatocitos no transformada (Chang liver cells), que representan diferentes niveles de tumorigenicidad y diferenciación. Se encontró que el DENV serotipo 2 se adhirió de igual manera a los 5 tipos de células, pero la tasa de replicación fue mayor en las células de hepatoma diferenciadas Huh 7, PLC y Hep3B. Factores relacionados con la diferenciación, así como tumorigenicidad, parecen desempeñar un papel fundamental aunque los mecanismos de acción siguen siendo poco claros. Las células más utilizadas para el estudio de la infección del virus dengue en hepatocitos son HepG2

(Marianneau *et al.*, 1996, 1997) y Huh7 (Hilgard, *et al.*, 2000; Alcon-LePoder *et al.*, 2005; Sessions *et al.*, 2009; Vasilakis *et al.*, 2009; Nasirudeen *et al.*, 2011).

Interacción Virus Dengue-Hospedero

Para tratar de entender la patogénesis del DENV, se ha estudiado la interacción virus hospedero determinando los cambios en la expresión de genes de manera global, tanto a nivel del mensajero (Guy *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2007; Conceição *et al.*, 2010, Sessions *et al.*, 2013; Sessions *et al.*, 2009) como de proteína (Kanlaya *et al.*, 2010; Pattanakitsakul *et al.*, 2007). En dichos estudios se ha reportado que las principales alteraciones ocurren en la vía del interferón tipo I (IFN), sistema ubiquitin proteasoma (UPS) y el metabolismo de lípidos (Fig. 2.1)

Diferentes reportes indican que una de las vías involucradas en la infección por DENV es la vía del interferón tipo I (Guy *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2007; Conceição *et al.*, 2010; Sessions *et al.*, 2013), la inducción de esta vía es la primer línea de defensa de la célula contra la infección por DENV. El genoma viral en la célula es detectado por un receptor de reconocimiento de patrones, como RIG-1, MDA-5 y TLR3 (Nasirudeen *et al.*, 2011). Debido a la señalización desencadenada por este reconocimiento se induce la producción de IFN. En un análisis transcriptómico de células infectadas con DENV se encontraron sobre expresados estos receptores (Conceição *et al.*, 2010). El IFN secretado activa el receptor de IFN y este a su vez la vía de señalización JAK/STAT, permitiendo la fosforilación STAT1/2 y la formación del complejo ISGF3, que transloca al núcleo y activa ISRE (IFN-stimulated regulatory elements) (Takaoka y Yanai, 2006).

Este proceso tiene como resultado la expresión de cientos de genes, y el establecimiento de una respuesta antiviral (Muñoz-Jordan, 2010). Las proteínas virales no-estructurales NS4B, NS2A y NS4A bloquean la fosforilación de STAT1. Además, NS5 se une a STAT2 y facilita su degradación (Muñoz-Jordan *et al*, 2003; Jones *et al*, 2005). Estas interacciones tienen como consecuencia la reducción de la activación de genes celulares regulados por IFN.

Otra de las vías que se encuentra alterada en respuesta a la infección por DENV es el sistema ubiquitin-proteasoma (UPS). Este sistema representa la mayor vía extralisosomal para regular la degradación de proteínas mal plegadas y mantener la homeostasis protéica. El sistema UPS está presente en una gran variedad de procesos celulares, tales como la regulación del ciclo celular, la reparación de ADN, la presentación de antígenos, apoptosis, transducción de señales y regulación transcripcional (Glickman *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el DENV manipula componentes del UPS, tanto en líneas celulares como en pacientes infectados (Fink *et al.*, 2007, Sessions *et al.*, 2009, Kanlaya *et al.*, 2010).

El metabolismo de lípidos es una vía involucrada en la infección por DENV. Este virus induce degradación de gotas lipídicas por medio de autofagia, para movilizar triglicéridos que pueden ser utilizados como energía (ATP) por medio de la vía de beta oxidación (Heaton y Randall, 2011). También, se ha observado un aumento en la biosíntesis de lípidos y se ha reportado que el dominio proteolítico de la proteína viral no estructural NS3 interacciona con la ácido graso sintasa (FASN), un factor indispensable para la replicación del DENV. Una vez reclutada FASN por NS3 en los sitios de replicación del ARN viral, ocurre un incremento en la actividad enzimática de

FASN que resulta en un aumento de la síntesis de lípidos, que facilita el rearrreglo de membranas en los complejos de replicación virales (Heaton *et al.*, 2010). Uno de los lípidos de mayor relevancia en la infección con DENV es el colesterol, el cual está implicado en distintas etapas del ciclo de replicación del virus (Rothwell *et al.*, 2009). La presencia de colesterol en la envoltura viral es necesaria para la fusión de membranas del endosoma tardío y la envoltura viral (Carro y Damonte., 2013). Por otro lado, se conoce que la entrada del virus dengue a macrófagos es dependiente de microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol (Puerta-Guardo *et al.*, 2010; Reyes-Del Valle *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha visto que inhibidores de la síntesis de colesterol (Lovastatina) inhiben el ensamblaje de la partícula viral en células endoteliales (HMEC) y en menor grado en células Vero (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2011).

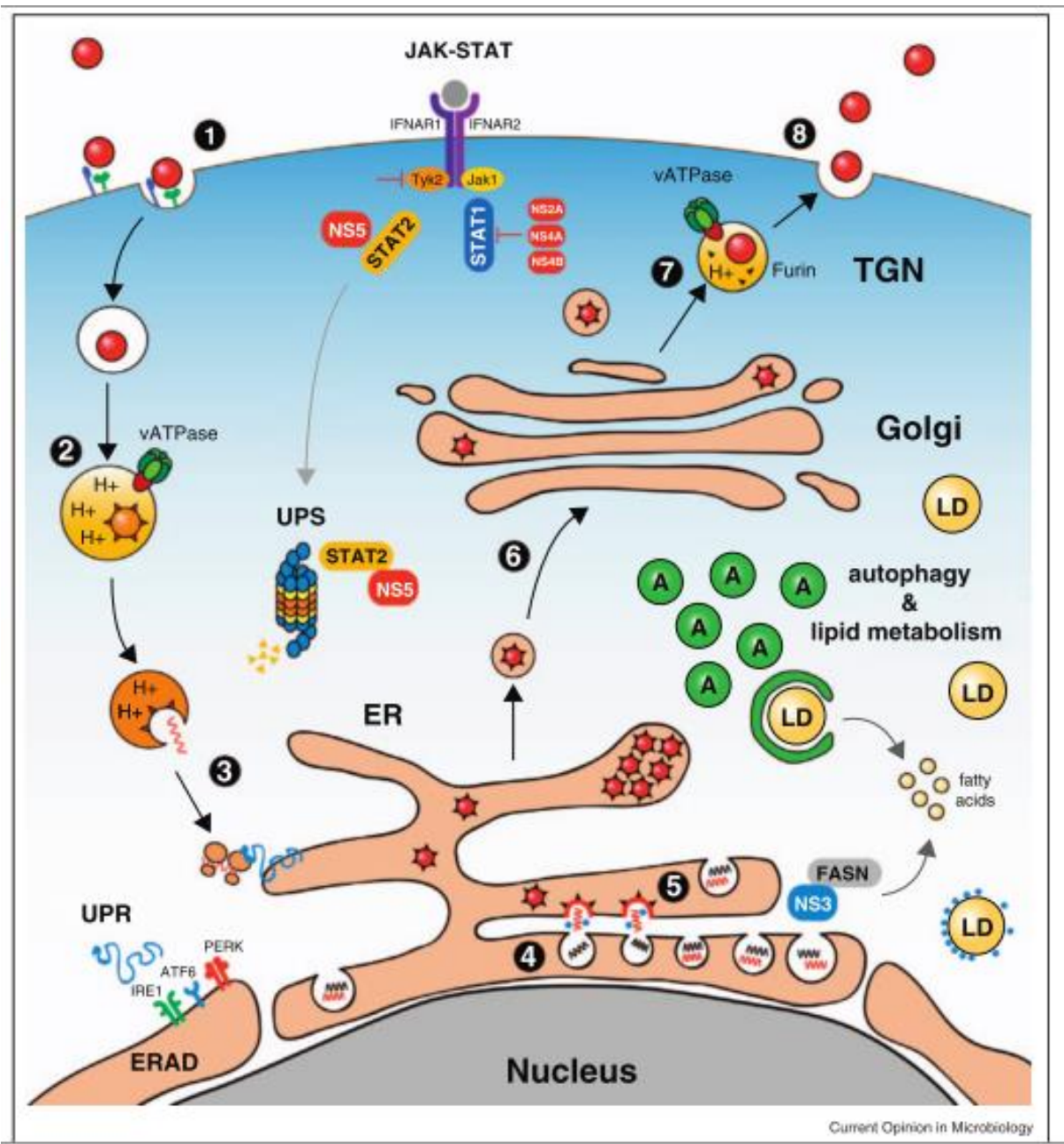


Figura 2.1. Vías de la célula hospedera afectadas durante el ciclo de replicación de DENV. Las vías principalmente alteradas durante el ciclo de replicación del virus son la vía del Interferón, ya que las proteínas NS2A y NS4B impiden la fosforilación de STAT1, mientras que NS5 promueve la degradación de STAT2 por medio del UPS, lo que impide la regulación de genes de respuesta a interferón. Las gotas lipídicas (LD) son degradadas por autofagia y la proteína viral NS3 estimula la ácido graso sintasa (FASN) para la biosíntesis de ácidos grasos. Tomada de Fischl y Bartenschlager, 2011.

III. HIPÓTESIS

Las células Huh7 responden a la infección con DENV cambiando los niveles de expresión de proteínas celulares, las herramientas de la proteómica cuantitativa como el marcaje con isotopos estables y su posterior análisis por espectrometría de masas permiten identificar estos cambios de manera global.

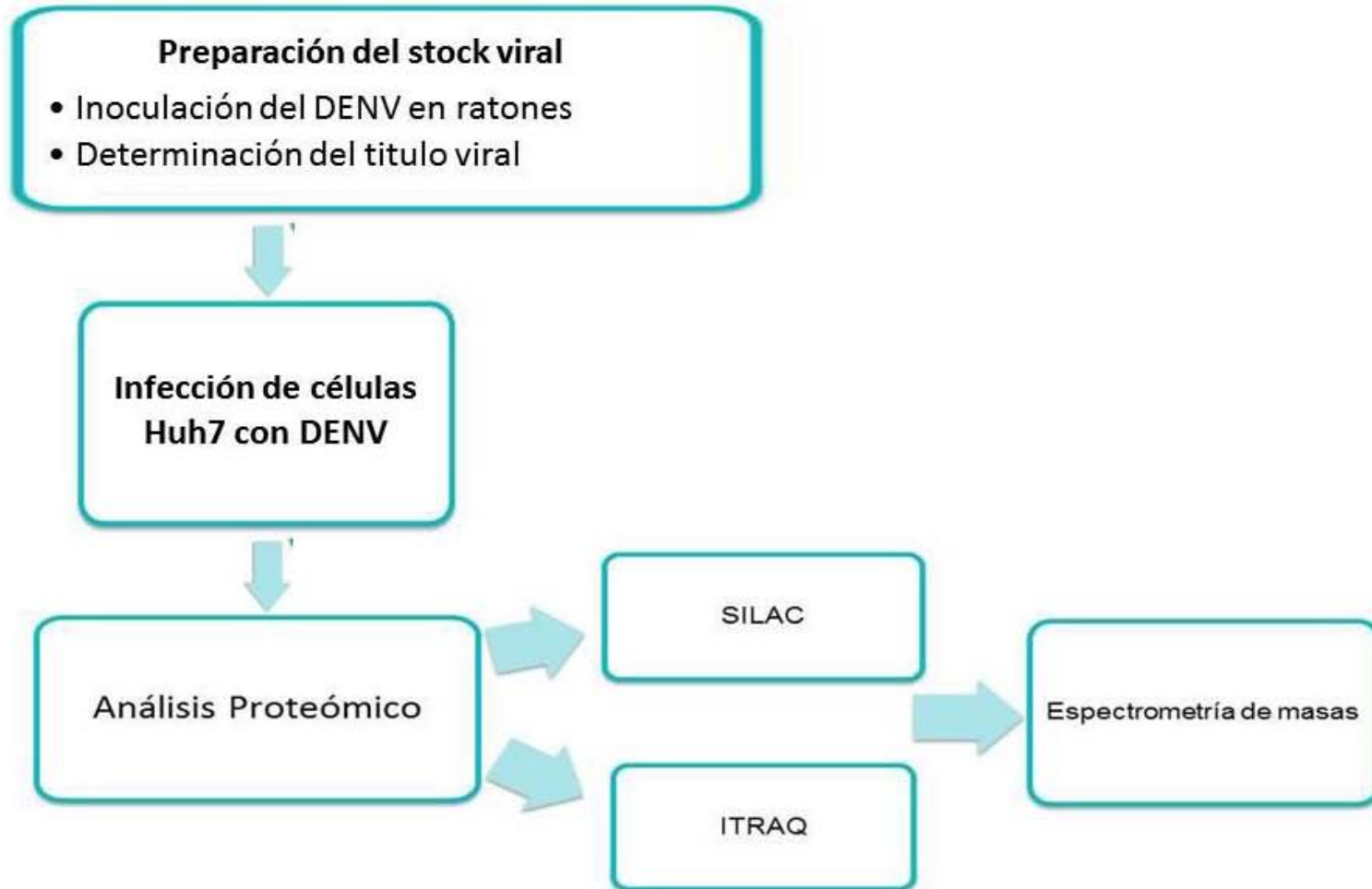
IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión diferencial de proteínas en células Huh 7 tras la infección por el DENV a través del marcaje isotópico estable y de la espectrometría de masas de alta resolución.

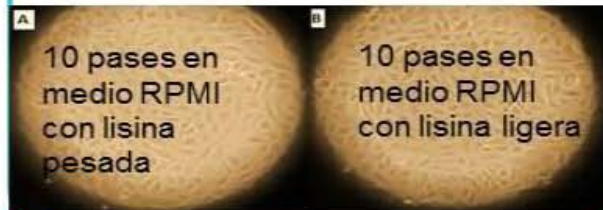
V. METODOLOGÍA

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



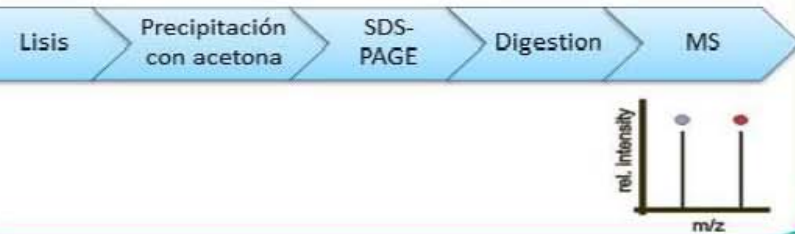
SILAC

Marcaje por incorporación de lisina pesada a las proteínas

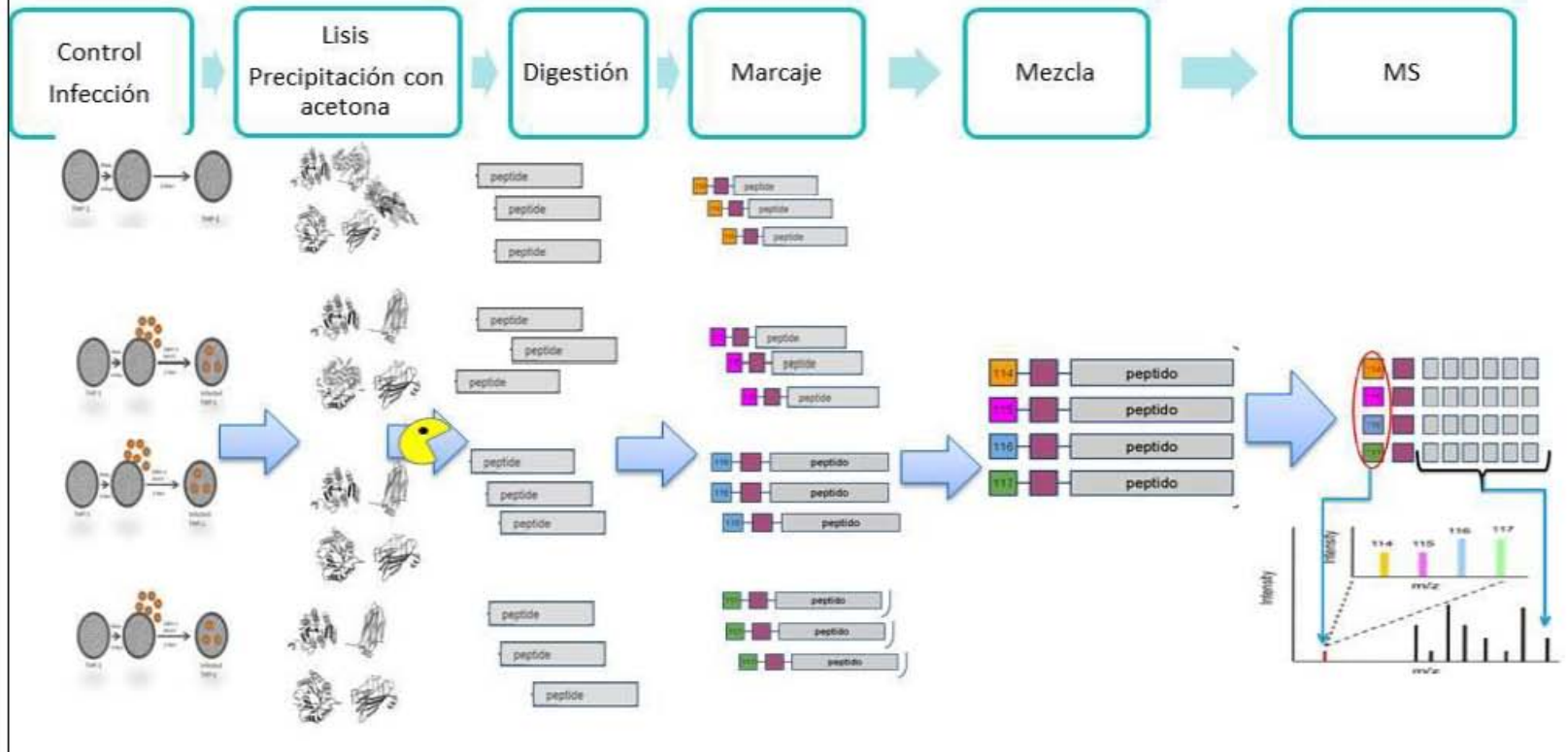


- Infección de las células con DENV2
- Control

Comprobación de la incorporación de lisina pesada



iTRAQ



5.1. CÉLULAS

Se empleó la línea celular Huh 7 derivada de hepatoma de humano proporcionada por la Dra. Rosa María del Ángel del CINVESTAV. Para su mantenimiento la línea celular fue cultivada en medio *Advanced Dubelco Modified Eagle* alta glucosa reducido en suero (DMEM advance, Invitrogen) suplementado con 5% de Suero fetal bovino (SFB) inactivado y glutamina (GIBCO). Los cultivos celulares fueron incubados en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C, después de formar una monocapa confluyente las células se trataron con 0.02% de EDTA y 0.01% de tripsina para desprenderlas. La suspensión obtenida se cultivó en frascos de diferentes áreas dependiendo del número de células necesarias para cada experimento.

Para los ensayos de proteómica las células se cultivaron en medio RPMI SILAC (Invitrogen), que no contiene lisina, ni arginina es necesario adicionarlas. La arginina fue la misma para preparar ambos medios, en el caso de la lisina una población creció en medio con lisina pesada (¹³C) y otra con lisina normal.

Las células C6/36 se cultivaron en MEM suplementado con 10% de SFB.

5.2. PREPARACIÓN DEL STOCK VIRAL

El virus utilizado correspondió a la cepa DENV-2 Yuc18500, la cual fue aislada de un paciente con FHD durante una epidemia de dengue ocurrida en el 2007 en Mérida, Yucatán Mexico. La cepa fue donada amablemente por la Dra. Ma. Isabel Salazar del Instituto Politécnico Nacional.

PROPAGACIÓN DEL DENV

Propagación de virus en ratones

En ratones de la cepa BALB/c con 2 días de nacidos se inocularon intracranealmente 10 μ L del virus a propagar. De 4 o 5 días post infección, los ratones fueron sacrificados para colectar los cerebros y lisarlos con ayuda de una jeringa de insulina de 1 ml y por sonicación. Se centrifugó el homogenizado a 10 000 xg durante 15 min a 4°C y los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración a través de un filtro con tamaño de poro de 0.2 μ m y almacenados a -70°C hasta su uso.

Propagación de virus en células C6/36

A continuación, el virus se propago en monocapas de células C6/36 crecidas a un 80% de confluencia en frascos de 75cm² las cuales fueron infectadas a una MOI 0.1 con el DENV-2. Posteriormente se incubaron por 2h para permitir la adsorción del virus se lavó 2 veces la monocapa de células y se colocó medio MEM con 2% de suero fetal bovino. El virus se cosecho cuando las células mostraron efecto citopático y se almacenó en alícuotas a -70°C hasta su uso.

TITULO VIRAL

Determinación del título viral por el método de formación de placas

Para obtener el título viral de los lisados, se determinó el número de unidades formadoras de placas (UFP/mL) mediante un ensayo de plaqueo en células BHK. Las células cultivadas en placas de 24 pozos fueron infectadas con 0.2mL de dilución del stock del DENV2 en medio Hanks, se hicieron diluciones de 1:10 hasta 1:10⁷, se incubaron durante dos horas a 37°C y 5% de CO₂ para permitir su adsorción. A continuación se removió el inculo, se lavó y se adicionó cuidadosamente 1 ml de carboximetilcelulosa al 0.8% en medio Hanks con SFB al 10%.

Las cajas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 6 días, después de este tiempo se tiñeron con azul de naftol para poder contar las placas observadas en la mayor dilución se emplea la siguiente fórmula para determinar las UFP/mL:

$$\text{UFP/mL} = \# \text{ de placas} \times 5 \times \text{Factor de dilución}$$

En donde 5 es el factor de corrección correspondiente a 0.2mL de inculo.

5.3. INFECCIÓN EN CÉLULAS Huh 7

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS INFECTADAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Un millón de células Huh 7 fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.25, durante 24 h, después de este periodo de tiempo se lavaron con PBS frío, se despegaron con tripsina- EDTA y se lavaron una vez con 1% de SFB en PBS frío.

La membrana celular fue permeabilizada con saponina durante 20 min a 4°C. Se adicionó el anticuerpo primario hb 112 hibridoma mouse en contra E dengue previamente estandarizado en una dilución 1:200. Después de 20 min de incubación a 4°C en oscilación lenta se lavó con PBS 2 veces. El anticuerpo secundario anti ratón conjugado con FITC fue agregado en una dilución 1:200. Se incubó a 4°C por 20 min en oscilación lenta. Para fijar las células, una vez disgregado el botón celular, se adicionaron 100 uL de paraformaldehído al 1% en PBS. El análisis se realizó en el citómetro FACScalibur y el análisis de los datos con el paquete computacional Flowing software 2 desarrollado por Perttu Terho en la Universidad de Turku, Finlandia.

5.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Lisis celular

Para establecer el mejor método de lisis celular se utilizaron diferentes *buffers* para la lisis como el de urea-thiourea, RIPA, Trizol y *buffer* GlyNP40 (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Buffer de Lisis			
Urea-Thiourea	RIPA modificado	Trizol	GlyNP40
Urea 8 M Tiourea 2M Chaps 1% DTT	DTT 1 mM EGTA 1 mM Tris HCl 10 mM NaCl 158 mM Triton X 100 1% Deoxicolato 1% SDS 0.1%	Trizol	HEPES 50 mM KCl 150 mM MgCl ₂ 1mM Glycerol 10% NP-40 0.5%
Inhibidor de proteasas Roche			

Tres millones de células fueron lisadas con cada uno de los *buffer*. En el caso de Urea-thiourea, RIPA y GlyNP40 después de 20 min con el *buffer* de lisis a 4°C, se recuperó el sobrenadante por centrifugación. En el caso de las lisis con trizol se siguió el protocolo del fabricante: de la fase orgánica se precipitaron las proteínas con cuatro volúmenes de acetona fría a -20°C durante toda la noche, después de centrifugar se recuperó el precipitado. La pastilla se resuspendió en bicarbonato de amonio 50 mM.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el kit 2D Quant (Amersham Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante.

MARCAJE DE CÉLULAS CON SILAC

Una población de células Huh7 creció por 10 pases en medio RPMI suplementado con Lisina ^{13}C , se extrajo proteína tanto de esta población como de la población de células que crecieron en un medio con lisina ligera para hacer una mezcla 1:1 de la proteína obtenida en cada una de las poblaciones celulares. Para disminuir la complejidad de la muestra, las proteínas se separaron en base a su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (Schwanhaeusser *et al.*, 2009), siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970):

Para la preparación de los geles se utilizaron placas de vidrio de 7.5x10 cm con una separación de 1 mm. En la parte superior, fase de concentración del gel, tenía un porcentaje de poliacrilamida de 4% y en la parte inferior, fase separadora del gel, un porcentaje del 12.5% (tabla 5.4)

TABLA 5.4

Gel Separador (12.5 %)	
Agua Destilada	3.1 mL
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L
PSA 10%	100 μ L
TEMED	10 μ L
Acrilamida/Bisacrilamida	4.2 mL
Gel Concentrador (4%)	
Agua Destilada	3.0 mL
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
SDS 10%	50 μ L
PSA 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L
Acrilamida/Bisacrilamida	0.665 mL

La electroforesis se realizó a 100 V hasta que el frente de corrida salió por completo.

Los geles se tiñeron durante una hora con azul de Coomassie (30% de Metanol, 10% de ácido acético glacial, 0.2% de Azul Brillante de Comassie R-250).

Para contrastar las bandas de proteína del gel, se destiñó con (10% de ácido acético glacial, 30% de Metanol hasta la visualización de las bandas en los geles. Se seleccionó y corto una de las bandas para comprobar la incorporación de la lisina pesada.

Digestión en gel

Después de extraer la banda del gel, ésta se destiñe por completo con ácido acético al 10%, y posteriormente se deshidrata con acetonitrilo y se secar en un Sped vac.

Se incubó durante 30 min a 56°C en una solución 10 mM de DTT para reducir los puentes disulfuro. Luego se le agrega una solución de iodoacetamida y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se hacen 2 lavados con 50% de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 50 mM para después secarlo en el Speed vac. A continuación, la muestra fue digerida con 0.5 ug de tripsina en un volumen suficiente para cubrir el gel durante toda la noche a 37°C.

Posterior a la incubación toda la noche se extraen los péptidos del gel. Para esto se lava una vez con bicarbonato de amonio 100 mM, dos con 50% de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 50 mM y por último una vez con acetonitrilo. Todos los lavados se colectaron en un mismo tubo, se secan en Speed vac y se desalan con zip tip c18 proveedor.

Una vez determinada la incorporación de la lisina pesada a las proteínas la monocapa de células Huh 7 (población de células que creció en medio con lisina “ligera”) se infectaron con DENV a una MOI de 1 durante 24 hpi, mientras que un igual número de células pero de la población que incorporó lisina pesada fue el control negativo.

Después de 24 h de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se lisaron con urea/tiourea. Las proteínas se separaron por SDS PAGE, el gel se cortó en 19 segmentos para la digestión de acuerdo al protocolo de digestión en gel y cada uno de estos segmentos se analizó por espectrometría de masas.

MARCAJE DE CÉLULAS CON ITRAQ

Diez millones de células fueron infectadas con DENV-2 Yuc18500 a una MOI de 1.25 por triplicado, además de un control de células no infectadas. A las 24 hpi se lisaron las células con el *buffer* de urea/tiourea y las proteínas se precipitaron con acetona.

Digestión en solución con tripsina

Los puentes de disulfuro de las proteínas se redujeron con DTT 10 mM durante 30 min a 56°C. Posteriormente, la muestra se incubó con iodoacetamida 50 mM durante 30 min a temperatura ambiente bajo protección de la luz para permitir la alquilación de las cisteínas. Finalmente, se adicionó tripsina en una proporción 1:50 (enzima: sustrato). La digestión enzimática se realiza durante 24 h a 37°C. Las mezclas complejas de péptidos tripticos se desalaron con un cartucho Sepack vac C18 (Waters) y se secaron en un evaporador rotatorio Speed vac Savan-ThermoFisher.

Entonces, 350 ug de péptido de cada tratamiento se marcaron con iTRAQ de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez marcados los péptidos se mezclaron y desalaron en un cartucho Sepak c18 (Watters).

Separación por HPLC

En un HPLC Agilent 1200 se separó la mezcla de péptidos de acuerdo a su hidrofobicidad usando cromatografía de fase reversa en una columna Vydac C18 RP, de 250 mm de longitud, id 4.6 mm y tamaño de partícula 5 µm: Se uso un gradiente lineal de 0% del amortiguador A (0.12% TFA/Agua) a 60% de amortiguador B (0.1%

TFA/ACN) durante 60 min, posteriormente de 60% a 100% de amortiguador B en 1 min, para mantenerse isocrático en 100% de amortiguador B durante 9 min. El detector UV se ajustó en una longitud de onda 215 nm. Se recolectaron fracciones cada dos min, las cuales fueron mezcladas para obtener un total de 11 fracciones (F1-F11).

ANÁLISIS DE PÉPTIDOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para el análisis de espectrometría de masas se empleó un espectrómetro Orbitrap Velos acoplado a un sistema de cromatografía líquida con un flujo de 10 μ L/s. El gradiente utilizado en el caso de las muestras marcadas con SILAC fue de 20-60%B en 80 min, 60-80% en 10 min, se mantuvo en 80% de B durante 10 min, posteriormente 30 min 100% de B,

Para las muestras de ITRAQ el gradiente se estableció dependiendo de la fracción analizada con base al tiempo de retención de dicha fracción. Los péptidos se ionizaron mediante electrospray con aplicación de 2.2 kV.

La fragmentación de los péptidos se realizó mediante CID y HCD para los 4 iones más intensos con cargas +2 y +3. El método completo de análisis se encuentra en el anexo 1.

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La identificación de las proteínas se hizo de forma automática utilizando el motor de búsqueda SEQUEST del programa computacional Proteome Discovery. Para el análisis de los datos se establecieron los siguientes parámetros: tripsina como endoproteinasa, alquilación de cisteínas con iodoacetamida (Carbamidometilación), oxidación de metioninas, marcaje de lisina ^{13}C en el caso de las muestras de SILAC, y en el caso de ITRAQ este marcador en el amino terminal, lisinas y tirosinas.

La base de datos utilizada fue obtenida de UNIPROT: organismo *Homo sapiens* solo se incluyeron las proteínas revisadas en total contaba con 20,333 entradas.

MAX QUANT

Para las muestras marcadas con SILAC se utilizó el software MAX QUANT desarrollado por el grupo de Mathias Mann en el instituto Max Plank. (Cox, J. and Mann, M. 2008)

Para la identificación y cuantificación de proteínas se utilizaron los mismos parámetros mencionados anteriormente incluida la misma base de datos.

VI. RESULTADOS.

6.1. ESTABLECIMIENTO Y ESTANDARIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL DENV2 EN CÉLULAS Huh7

Para disminuir el error experimental en las réplicas biológicas de nuestros ensayos se preparó un stock viral suficiente 10mL para todos nuestros experimentos. Para la preparación de un stock viral se infectaron intracranealmente ratones recién nacidos con DENV2. A los 4 días postinfección (dpi) se observó que los ratones infectados crecieron menos que los no infectados (Figura 6.1), además mostraron aletargamiento y temblores, fue en este momento que se sacrificaron y se colectaron los cerebros. Para determinar el título del stock de virus se infectaron células BHK-21 con diluciones seriadas en base 10, después de 6 días se determinó el título viral contando directamente el número de placas observadas en la mayor dilución, tomando en cuenta el factor de dilución ($UFP/mL = \# \text{ de placas} \times 5 \times \text{Factor de dilución}$) en donde 5 es el factor de corrección correspondiente a 0.2mL de inóculo, por lo que el título fue 1×10^7 UFP/mL.



Figura 6.1. La infección con DENV afecta el crecimiento de los ratones. Para propagar el DENV2 Yuc18500 se infectaron intracranealmente ratones recién nacidos, 4 días postinfección los ratones infectados (izquierda) mostraron un menor crecimiento con respecto al testigo sin infección.

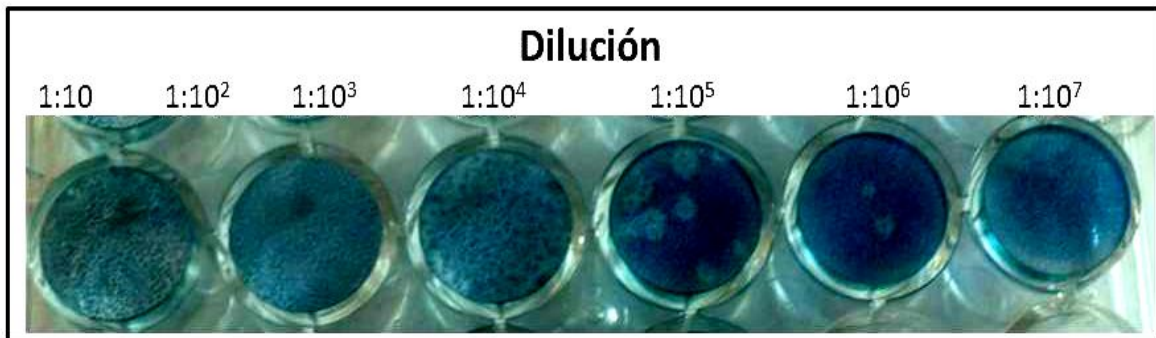


Figura 6.2. Formación de placas en células BHK. El stock viral fue titulado en monocapas de células BHK-21 infectadas con DENV2 Yuc18500 a diferentes diluciones, las placas se contaron al sexto día post infección, la concentración viral fue de 1×10^7 UFP/mL

INFECCIÓN EN CÉLULAS Huh 7

Como se mencionó anteriormente, las células Huh7 se han usado como modelo *in vitro* para la infección del DENV. Para determinar el porcentaje de células Huh 7 infectadas con DENV2 se usó citometría de flujo. Se analizó la presencia intracelular de la proteína viral de envoltura (proteína E) mediante un anticuerpo específico para esta proteína además de un anticuerpo secundario conjugado con FITC, posteriormente se leyó la fluorescencia por citometría de flujo. Para determinar el porcentaje de células infectadas se creó una gráfica de puntos (Figura 6.3 A) con los datos del análisis de las células control (células que no fueron infectadas, pero fueron tratadas al igual que las infectadas con ambos anticuerpos) en esta grafica se define el cuadrante que corresponde a la autofluorescencia, las células que tienen una mayor fluorescencia que la definida para las células control se consideran infectadas y se determina su porcentaje con respecto al número total de eventos. El porcentaje de infección obtenido fue 16% (Figura 6.3 B).

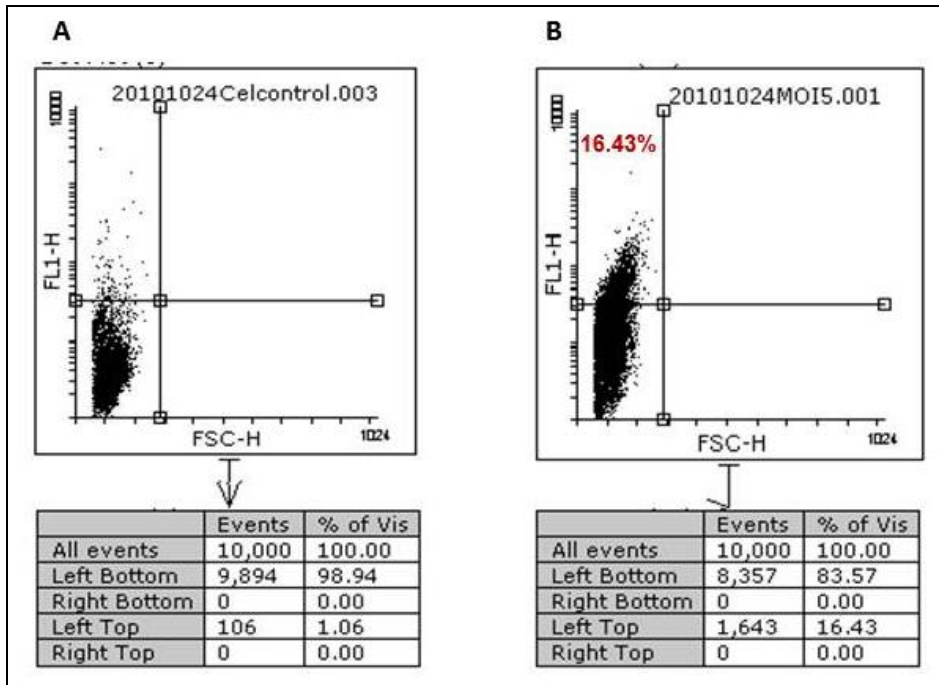


Figura 6.3 Citometría de flujo. Para determinar el porcentaje de células Huh7 infectadas con DENV2 Yuc 18110 se utilizó un anticuerpo primario contra la proteína E (4G2) y un anticuerpo contra ratón acoplado a FITC. **A.** Células control **B.** Células infectadas con una MOI de 1.25

6.2 ANÁLISIS PROTEÓMICO

Un punto importante en el análisis proteómico es la cantidad de muestra. Se conoce que la concentración del lisado de células puede variar de acuerdo al tipo de buffer y al tipo celular. Se usaron varios buffer de lisis para la obtención de proteínas a partir de células Huh7. Como se observa en la tabla 6.1 con el *buffer* de Urea/Tiourea se consigue una mayor cantidad de proteína, por lo que se eligió este buffer para obtener las proteínas en los análisis de proteómica cuantitativa.

Tabla 6.1		
<i>Buffer</i> de Lisis	Cantidad de proteína obtenida (µg)	Desviación estándar
Urea/Tiourea	493.75	4.60
RIPA modificado	420.8	4.82
Gly NP40	314.5	11.55
Trizol	81.2	6.41

*DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS
Huh7 INFECTADAS CON DENV2 MEDIANTE EL USO DE SILAC*

Antes de infectar las células Huh7 con DENV fue necesario marcar con lisina pesadas una población de células. Para realizar el marcaje SILAC se cultivaron células Huh 7 en medio RPMI con lisina “pesada”, la Figura 6.4 muestra que el cultivo en este medio no afectó la morfología de las células. La tasa de crecimiento en estas células con respecto a las que se cultivaron con lisina “ligera” tampoco se vio afectada, ya que si el mismo día se sembraba el mismo número de células en ambos medios, estas alcanzaban confluencia al mismo tiempo.

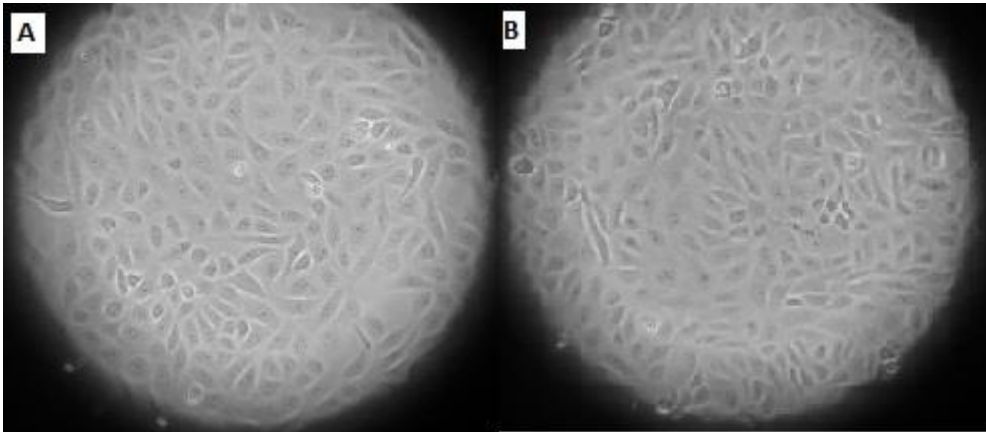


Figura 6.4. Morfología de las células Huh 7. A. células cultivadas en medio con lisina “ligera”.
B. células cultivadas en medio con lisina “pesada”

Para lograr una completa incorporación de la lisina pesada en las proteínas celulares, es necesario realizar por lo menos diez pases, cultivando las células en el medio con la lisina pesada y de manera paralela cultivar una población de células en medio con lisina ligera. Una vez que se hicieron estos diez pases se extrajeron proteínas de ambas poblaciones celulares, para comprobar que la lisina “pesada” estaba siendo incorporada a las proteínas durante la traducción. Las proteínas de las dos poblaciones celulares se mezclaron en cantidades iguales, esta mezcla se separó electroforéticamente y una de las bandas (Figura 6.5) se digirió con tripsina y se analizó por MS/MS. Como se observa en la Figura 6.5 la lisina pesada se incorporó a las proteínas de las células, esto lo sabemos porque en el espectro de masas hay un par de iones precursores con una diferencia de masa de 6 Da. El análisis de las fragmentaciones para estos dos iones precursores nos da la misma secuencia, lo que confirma que se trata del mismo péptido y la diferencia de masa en el precursor se debe a que la lisina tiene seis ^{13}C .

El análisis de los espectros generados se llevó a cabo con el software MAXQUANT para realizar tanto identificación como cuantificación. La proteína presente en esta banda analizada fue la beta tubulina, de la cual se identificaron 8 péptidos únicos.

Después de que se comprobó que las proteínas estaban siendo marcadas metabólicamente por medio de la incorporación de la lisina pesada, el siguiente paso para determinar que proteínas celulares cambiaban tras la infección con DENV fue extraer las proteínas de diez millones de células Huh 7 infectadas a una MOI de 1 durante 24 h. Se decidió infectar las células sin marcaje y dejar como control las células marcadas, ya que el virus se encontraba en medio con lisinas “ligera” y esto podría

interferir. Después de la lisis se cuantificó la cantidad de proteína obteniendo las siguientes concentraciones.

- Huh 7 en medio con lisina ligera infectada con DENV2 1.05 mg/mL
- Huh 7 en medio con lisina pesada sin infectar 1.1 mg/mL.

Las proteínas de ambas condiciones se mezclaron en una relación 1:1 proteína:proteína. Para reducir la complejidad de proteínas en la muestra, éstas se separaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Coomassie R 250. El gel completo se cortó en 19 partes y cada una se digirió con tripsina por separado como lo muestra la figura 6.6.

Los péptidos obtenidos de tres partes de gel se analizaron mediante espectrometría de masas, se identificaron 70 proteínas pero de éstas solo se pudo hacer cuantificación de 27 (Tabla 6.2). La digestión con tripsina escinde las proteínas en lisina y arginina. Debido a que teníamos marcaje en la lisina solo los péptidos que la tengan presente son cuantificables, solo se pudieron cuantificar 27 proteínas. No se pudo continuar analizando el resto de los fragmentos debido a problemas técnicos con el espectrómetro de masas. Cuando se repitió el proceso solo se identificaron 58 proteínas pero de estas solo se cuantificaron 5. No se logró realizar la cuantificación ya que no se encontraban los péptidos marcados, por lo que se decidió hacer el análisis de la expresión diferencial de proteínas por medio de ITRAQ

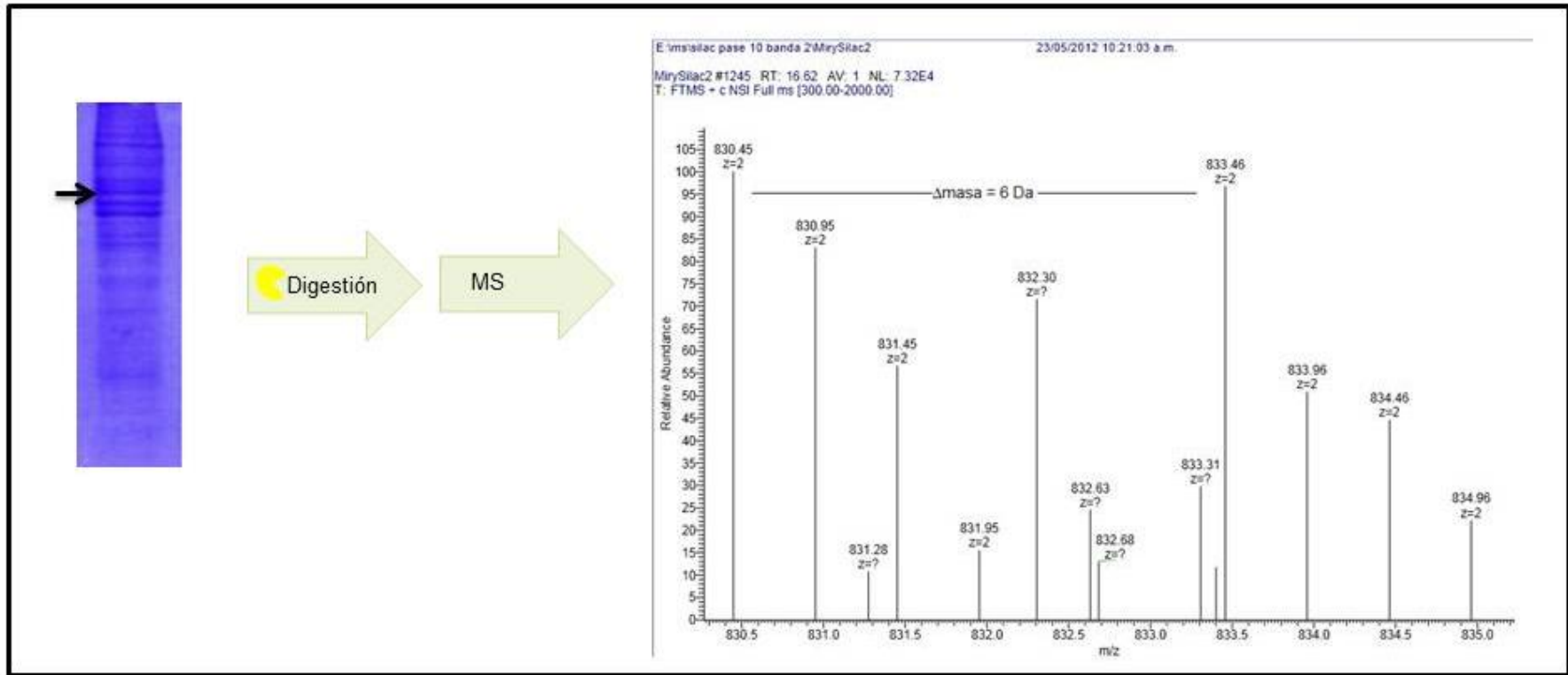


Figura 6.5. Análisis de la incorporación de lisina pesada a las células Huh7. Electroforesis de una muestra de proteínas del pase 10 de ambas poblaciones celulares en una mezcla 1.1 (pesado: ligero), la banda señalada con la flecha negra se digirió con tripsina y se analizó por MS. En el lado derecho de la imagen se muestra un ejemplo de dos de los iones precursores que tienen una diferencia de masa de 6 Da, lo esperado en el marcaje con SILAC.

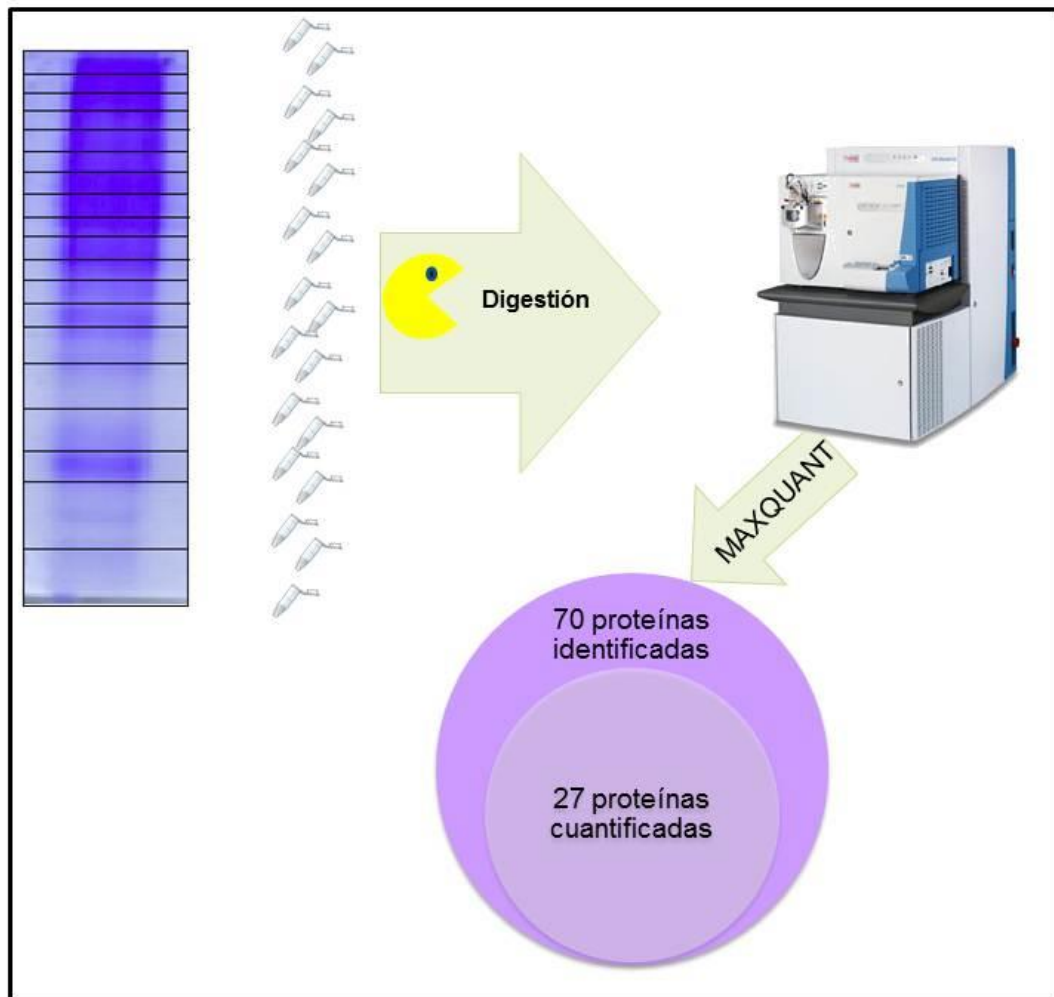


Figura 6.6. Identificación de proteínas marcadas por SILAC durante la infección de células Huh 7 infectadas con DENV2. Células huh7 se infectaron con DENV2. La mezcla de proteínas de células Huh7 infectadas y sin infección se separó por SDS-PAGE, el gel obtenido se dividió en 19 partes como se muestra en el lado izquierdo de la imagen. Cada una de esas partes se digirió por separado con tripsina. Los péptidos tripticos se analizaron por MS/MS, de los espectros generados se identificaron y cuantificaron las proteínas con la ayuda del software Maxquant. Logrando identificar 70 proteínas y cuantificar 27 de ellas.

TABLA 6.2. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS Y SU CUANTIFICACIÓN RELATIVA

PROTEÍNA	RELACIÓN L/H NORMALIZADA
P27797 Calreticulin	1.401207841
P68104 Elongation factor 1-alpha 1	1.373626374
O60701 UDP-glucose 6-dehydrogenase	1.293242806
P04083 Annexin A1	1.18908892
P68363 Tubulin alpha-1B chain	1.180470299
P22626 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	1.158171479
Q15084-2 Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	1.143719834
P06748 Nucleophosmin	1.11531212
P60709 Actin, cytoplasmic 1	1.074010031
P07437 Tubulin beta chain	1.057026584
Q99832 T-complex protein 1 subunit eta	1.056658002
P07355-2 Isoform 2 of Annexin A2	1.034864588
P07237 Protein disulfide-isomerase	1.025020757
P26599-3 Isoform 3 of Polypyrimidine tract-binding protein 1	1.023792948
P15121 Aldose reductase	1.004076551
P61978-2 Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0.997207818
Q01518 Adenylyl cyclase-associated protein 1	0.99631364
P07910 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	0.967679505
P08670 Vimentin	0.961815908
P14866 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	0.960430273
P09651 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	0.942240648
P14618 Pyruvate kinase isozymes M1/M2	0.916002565
P10809 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0.911909539
P04406 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.877577885
B4DE31 cDNA FLJ54957, highly similar to Transketolase (EC 2.2.1.1)	0.841467519

*DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS
Huh7 INFECTADAS CON DENV2 MEDIANTE EL USO DE ITRAQ*

Para determinar la expresión diferencial de proteínas en células Huh7 infectadas con DENV2, se extrajeron proteínas de tres replicas biológicas de la infección y un control sin infectar. Estas proteínas se precipitaron y digirieron de acuerdo a lo indicado en materiales y métodos. Los péptidos trípticos se marcaron con iTRAQ. Después del marcaje se mezclaron los péptidos de las 4 condiciones (114: control, 115, 116,117: replicas biológicas de la infección). Para reducir la complejidad de la muestra, ésta se separó en 11 fracciones por medio de HPLC de fase reversa. La figura 6.7 muestra el cromatograma en el cual se indican las fracciones que se analizaron por espectrometría de masas.

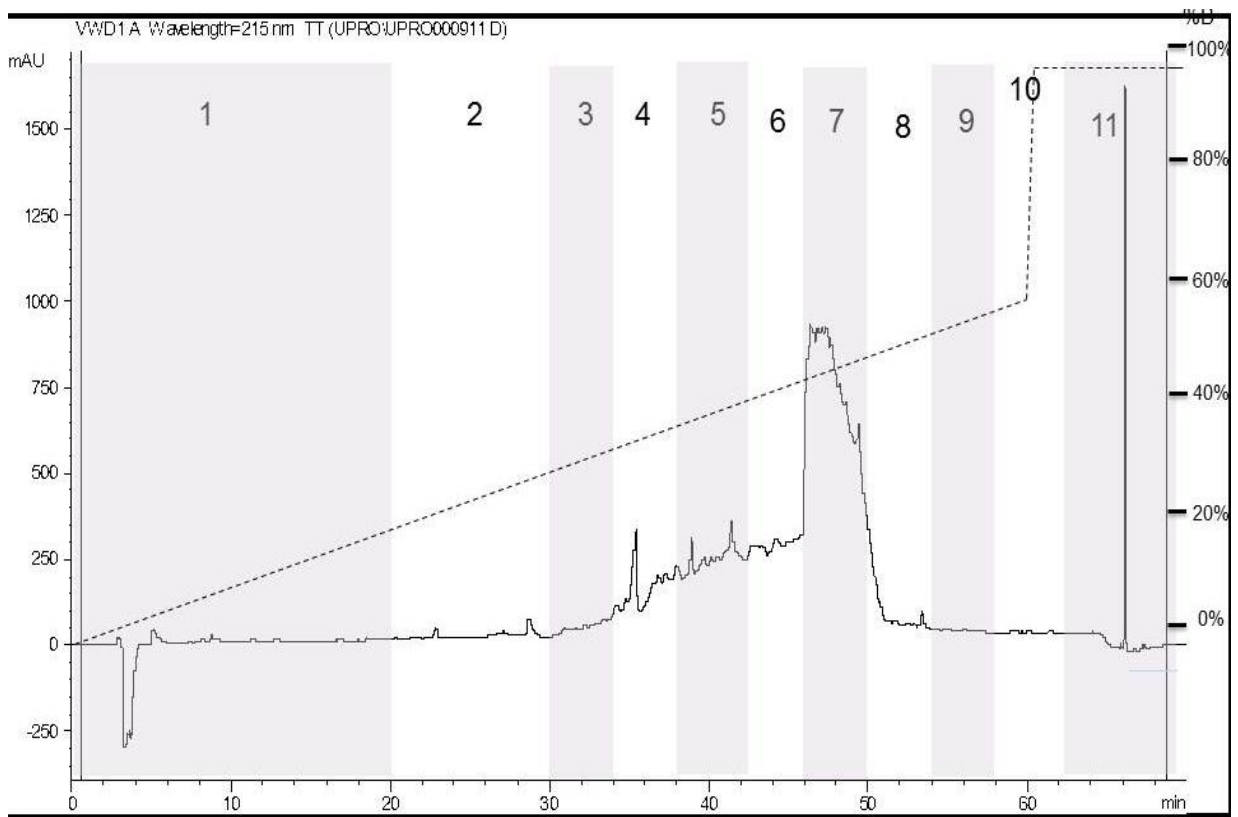


Figura 6.7. Cromatograma de la mezcla de péptidos marcados con ITRAQ. Para reducir la complejidad de la muestra previo a su análisis por espectrometría de masas se separó por HPLC de fase reversa. En la parte superior se muestra las fracciones en las que se separó la muestra, la línea punteada muestra el gradiente utilizado.

Después del análisis por espectrometría de masas se identificaron 143 proteínas. Para determinar el punto de corte a partir del cual se consideraba la proteína diferencialmente expresada se analizaron los cocientes de la intensidad de los iones reporteros correspondientes a la muestra infectada con respecto a la intensidad del ion reportero del control (infectado/control). Como un mismo péptido puede aparecer varias veces durante el análisis en el espectrómetro de masas se tomó la desviación estándar de los cocientes infectado/control de todas las veces que aparecía un mismo péptido en el espectro, y con el promedio de la desviación estándar de todos los péptidos se determinó el punto de corte como ± 3 desviaciones estándar del promedio de los cocientes. La figura 6.8 muestra la dispersión del \log_2 de los cocientes infectado/control de las proteínas, así como los puntos de corte empleados para determinar si hubo expresión diferencial. Al calcular el \log_2 de los cocientes los valores menores a uno serán negativos (propiedad del logaritmo en base 2), los mayores a uno serán positivos y el \log_2 de 1 es cero. Con este criterio se estableció que 11 proteínas se encuentran diferencialmente expresadas de las cuales tres disminuyeron su abundancia, mientras que 8 la aumentaron (Tabla 6.3), con respecto al control sin infección. Estas proteínas se analizaron en Panther para determinar cuál es su función molecular, en que procesos biológicos están involucrados y de que componente celular forman parte (Tabla 6.4)

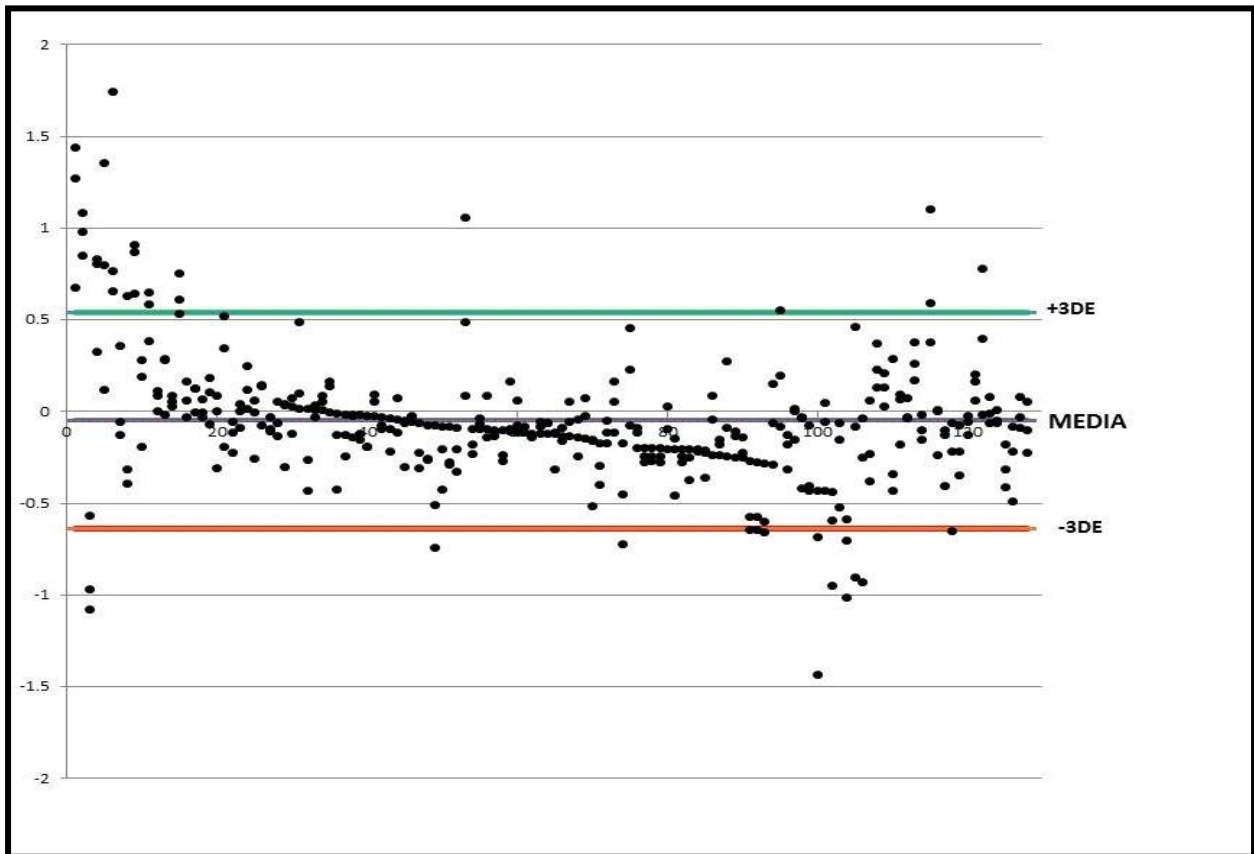


Figura 6.8. Dispersión del \log_2 de los cocientes de iTRAQ. En la gráfica se muestra la dispersión de los cocientes de las intensidades de los iones reporteros correspondientes a las muestras infectado/Control. En rojo se muestra el límite que se definió como punto de corte para las proteínas que disminuyen su expresión, en verde el punto de corte para las proteínas sobre expresadas. Al calcular el \log_2 de los cocientes los valores menores a uno serán negativos (propiedad del logaritmo en base 2), los mayores a uno serán positivos y el \log_2 de 1 es cero. Lo que facilita la observación de los datos, como un número negativo si baja su expresión o positivo si la expresión aumenta, con respecto al control.

TABLA 6.3 PROTEÍNAS QUE CAMBIAN SU EXPRESIÓN

UNIPROT ID	PROTEÍNA	Relación Normalizada Infectado/Control		
		115/114	116/114	117/114
PROTEÍNAS SOBRE EXPRESADAS				
Q7Z3Z3	Piwi-like proteína 3	2.71315	1.59426	2.41106
Q9BUR5	Apolipoprotein O	2.11981	1.80119	1.9689
P08670	Vimentin	1.78098	1.25221	1.74385
P39019	40S ribosomal protein S19	1.73714	1.08787	2.56138
Q9BZF2	Oxysterol-binding protein-related protein	1.55885	1.87609	1.82665
P18124	60S ribosomal proteína L7	1.44768	1.68743	1.52759
Q7Z7A4	PX domain-containing protein kinase-like protein	1.70023	1.57776	3.34543
Q8IWU5	Extracellular sulfatase	2.14627	1.50682	1.30172
PROTEÍNAS SUB EXPRESADAS				
Q8NDY8	Transmembrane protein 52	0.67408	0.47292	0.51149
Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial	0.73746	0.66343	0.51798
O94759	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2	0.61401	0.49522	0.66592

TABLA 6.4 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE CAMBIAN SU EXPRESIÓN

PROTEINA	FUNCIÓN MOLECULAR	PROCESOS BIOLÓGICOS	COMPONENTE CELULAR
Piwi-like proteína 3	Unión a ARN	Diferenciación celular Silenciamiento de genes por ARN Meiosis Desarrollo de organismos multicelulares Regulación de la traducción Espermatogénesis Desarrollo de organismos multicelulares Generación de gametos femeninos Procesos metabólicos de nucleobase, nucleosido, nucleótido y ácidos nucleicos	citoplasma
Apolipoprotein O	-	Transporte de lípidos	Espacio extracelular HDL LDL VLDL

TABLA 6.4 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE CAMBIAN SU EXPRESIÓN (Continuación)

PROTEÍNA	FUNCIÓN MOLECULAR	PROCESOS BIOLÓGICOS	COMPONENTE CELULAR
Vimentin	Constituyente estructural del citoesqueleto	Diferenciación de células gliales Desarrollo de los astrocitos Componente celular desensamblaje involucrado en fase de ejecución de la apoptosis Organización filamentos intermedios Desarrollo de las células de fibra lente Filamentos musculares deslizantes Regulación negativa del desarrollo de las neuronas de proyección Interacción virus-huésped	Citoplasma Filamentos intermedios
40S ribosomal protein S19	Constituyente estructural del ribosoma Unión a ácidos nucleicos	Traducción	Nucléolo Subunidad pequeña del ribosoma

TABLA 6.4 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE CAMBIAN SU EXPRESIÓN (Continuación)

PROTEÍNA	FUNCIÓN MOLECULAR	PROCESOS BIOLÓGICOS	COMPONENTE CELULAR
Oxysterol-binding protein-related protein	Unión a colesterol Unión a fosfolípidos	Transporte de lípidos Respuesta celular a colesterol Transporte de lípidos Regulación positiva de procesos catabólicos de proteínas	Vacuola autofágica Citosol RE perinuclear Membrana plasmática
60S ribosomal proteína L7	Constituyente estructural del ribosoma Unión a ácidos nucleicos	Traducción	Subunidad grande del ribosoma
PX domain-containing protein kinase-like protein	Actividad de cinasa Unión a fosfatidil inositol Unión al extremo C-terminal Actividad de transferasa	Cascada de señalización intracelular Comunicación celular Respuesta inflamatoria Regulación negativa del transporte de iones Regulación de la transmisión sináptica	Centrosoma Citoplasma Núcleo Membrana plasmática
Extracellular sulfatase	Actividad hidrolasa	Procesos metabólicos del sulfato Procesos metabólicos de polisacáridos Procesos metabólicos de fosfolípidos	RE Golgi Superficie celular

TABLA 6.4 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE CAMBIAN SU EXPRESIÓN (Continuación)

PROTEÍNAS SUB EXPRESADAS			
PROTEÍNA	FUNCIÓN MOLECULAR	PROCESOS BIOLÓGICOS	COMPONENTE CELULAR
Aconitate hydratase, mitochondrial	Actividad hidrolasa	Ciclo del ácido tricarboxílico Procesos metabólicos de carbohidratos Procesos biosintéticos de aminoácidos. Muerte celular.	Matriz mitocondrial
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2	ADP-ribosa di fosfatasa Actividad de canal de calcio Actividad de transportador transmembranal de Manganeso Actividad de canal de sodio	Respuesta a peróxido de hidrogeno Transporte de sodio	Membrana citoplasmática
Transmembrane protein 52	-	-	Membrana

VII. DISCUSIÓN

En las últimas décadas la incidencia y prevalencia del dengue ha aumentado en los países de las zonas tropicales y subtropicales, incluido México. A pesar de la importancia del dengue en salud pública, aún no existe una vacuna profiláctica o terapia antiviral específica. La FHD es una enfermedad multifactorial compleja, que involucra diferentes procesos biológicos y es determinada por una serie de interacciones entre el virus, la respuesta inmune y factores genéticos del huésped. Lamentablemente, se desconoce a profundidad los mecanismos moleculares de la fisiopatología de la enfermedad. Se ha visto que la replicación de DENV es fácilmente contralada en la mayoría de individuos después de un corto período de viremia, aunque no se conocen que factores del huésped participan en esta regulación.

Se tiene como hipótesis que el amplio tropismo del virus dengue en humanos es un factor determinante en su patogénesis. Se conoce que el virus dengue infecta células del sistema inmunológico, hepáticas y endoteliales (Martina *et al.*, 2009).

Se ha reportado al hígado como un sitio de replicación viral, en donde patológicamente se describe necrosis mediozonal y a veces centrolobular, hepatocitos apoptóticos, hipertrofia de las células de Kupffer, esteatosis e infiltración portal mononuclear (Seneviratne *et al.*, 2006). El hígado es un órgano que realiza una importante contribución a la defensa del hospedero sintetizando varias moléculas defensivas que incluyen componentes del sistema del complemento, factores de coagulación, y citocinas como IL-6 y RANTES, que tiene actividad quimiotáctica sobre células T, monocitos, células *natural killer* (Lin *et al.*, 2000). Si bien es evidente que el virus replica

en el hígado, aún no se sabe cuál es la participación de los hepatocitos en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad.

Este trabajo tiene como objetivo conocer que proteínas del hepatocito cambian su expresión como consecuencia de la infección con el DENV, se utilizó como modelo de infección las células Huh 7 derivadas de hepatoma humano. Trabajos previos donde se analiza el efecto de la infección del virus dengue en distintos tipos celulares muestran cambios en la expresión de genes a nivel mensajero (Ekkapongpisit *et al* 2007; Conceição *et al.*,2010; Guy *et al* 2011., Fink *et al.*2007, Sessions *et al.*,2013), así como en proteínas (Pattanakitsakul *et al.*, 2007). En el trabajo de Pattanakitsaku donde encuentran 17 proteínas expresadas diferencialmente en células HepG2, las proteínas encontradas por ellos no son las mismas que las encontradas por nosotros, sin embargo algunas de ellas están involucradas en los mismos procesos como el ciclo de Krebs y en la traducción.

Se evaluaron los cambios en el nivel de proteínas en células Huh 7 infectadas con el DENV, usando metodología de proteómica cuantitativa. Se identificaron 143 proteínas en total, de las cuales se 8 proteínas aumentaron su expresión respecto al control y 3 disminuyeron su expresión. Estas proteínas son parte de importantes procesos biológicos como transporte de lípidos, traducción, actividad antiviral por ARNi y respuesta a estrés oxidativo.

A continuación se describe la función de las proteínas encontradas:

Transporte de lípidos

En este trabajo encontramos dos proteínas la apolipoproteína O y la proteína de unión a oxisterol, que aumentan su expresión en comparación al control. La apolipoproteína O

forma parte de las lipoproteínas que están encargadas del transporte de lípidos en el torrente sanguíneo. La función principal de las apolipoproteínas es la de mantener la estructura de la lipoproteína, regular el metabolismo y transporte de triglicéridos, fosfolípidos y esteres de colesterol entre los órganos. Se ha reportado que la apolipoproteína está involucrada en el ciclo de replicación del virus de la hepatitis C, que al igual que el DENV pertenece a la familia Flaviviridae (Jieyun *et al.*, 2012). Hishik y colaboradores (2010) observaron que al usar una mutante para la proteína APOE que no era secretada al medio extracelular la cantidad de partículas infecciosas de HCV en el medio reducía dramáticamente y las partículas infecciosas se acumulaban dentro de la célula. En el caso específico de dengue hay observaciones de cambios en los niveles de apolipoproteínas en el suero de pacientes infectados con DENV (Albuquerque *et al.*, 2009).

Las proteínas de unión a oxisterol (OSBP) constituyen una familia de proteínas de unión/transferencia de lípidos que están presentes en células eucariontes (Raychaudhuri y Prinz, 2010). Estas proteínas se caracterizan por poseer un dominio OSBP en el extremo carboxilo terminal, el cual se une a una variedad de oxisteroles como 24-hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol, y tiene además tiene la capacidad de unión a colesterol (Im *et al.*, 2005), que es de gran importancia desde el punto de vista fisiológico ya que actúa como andamiaje para otras proteínas (Mousley *et al.*, 2012). Se ha reportado que OSBP participa en la replicación de patógenos intracelulares, como HCV, en donde se ha observado que OSBP interactúa en Golgi con la proteína no estructural NS5A de HCV. El *knock-down* de OSBP inhibe la secreción de partículas de HCV, además pueden actuar como sitio de contacto entre las membranas del RE y las membranas de replicación de virus para proveer un suministro de fosfatidilinositol,

colesterol, ceramidas y esfingomielinas a los sitios de replicación (Amako *et al.*, 2009). La OSBP controla el tráfico intracelular de membranas, ya que en mamíferos se ha visto que su depleción resulta en la fragmentación de Golgi, la inhibición del transporte de proteínas del RE a Golgi y la acumulación de colesterol en endosomas/lisosomas, lo que sugiere que la OSBP es necesaria para mantener la integridad funcional de la ruta secretoria controlando la composición lipídica (Ngo y Ridgway 2009). El DENV aprovecha el tráfico de membranas de la célula hospedera tanto para entrar a ella por endocitosis, como para salir de la célula por la vía secretoria (Rodhenius 2010).

Se sabe que el metabolismo de lípidos es importante durante la infección con DENV, El virus requiere un rearrreglo de membranas en los complejos de replicación virales, para favorecer este rearrreglo se incrementa la biosíntesis de lípidos, por una mayor actividad enzimática de la FASN (Heaton *et al.*, 2010), que también se ve reflejado en un cambio en el perfil de lípidos (Perera *et al.*, 2012). Como se mencionó anteriormente el colesterol es un factor importante para el desarrollo de la infección del virus dengue en distintas etapas del ciclo viral, diversos autores reportan su importancia en la entrada del virus a la célula (Puerta- Guardo *et al.*, 2010; Reyes-Del Valle *et al.*, 2005). Es importante durante la replicación, ya que cuando se inhiben las enzimas de la vía de síntesis de colesterol en células A549 y K562, no hay replicación de DENV (Rothwell *et al.*, 2009); también se ha mencionado su importancia en el ensamble de la partícula viral (Martínez- Gutiérrez *et al.*, 2011).

Respuesta antiviral

Otra proteína que aumenta su expresión respecto al control no infectado es la proteína PIWIL3. Se conoce que las proteínas Piwi son parte de la familia argonauta encargadas del silenciamiento de genes por ARN pequeños no codificantes. Éstas participan en el complejo multiprotéico denominado RISC (RNA-induced silencing complex) para silenciar la expresión de un ARN blanco de secuencia homóloga. Cuando la proteína Piwi es la encargada de este proceso los ARN silenciadores se denominan piARN, ARN de 24 a 30 nts (Kim *et al.*, 2009). Inicialmente los piARN se encontraron en células de línea germinal de *Drosophila*, pero ahora se sabe que no están confinados únicamente a esas células; también se han reportado en células de tejidos somáticos de mosca de fruta, ratón y macaco Rhesus, lo que sugiere que participan fuera de las células germinales (Yan *et al.*, 2011).

Recientemente se han encontrado piARN virales en células de insecto, lo que sugiere una participación antiviral para esta vía, ya que en células de *Drosophila* mutantes de Piwi aumenta su susceptibilidad a virus. Hess y colaboradores en 2011 reportan piARN virales en mosquitos *Aedes* y sugieren que esta vía está involucrada durante la infección por DENV en mosquitos.

En el caso de mamíferos, el ARN interferente también han sido reportados como parte de una respuesta celular a la infección, esto se ha visto en el virus de estomatitis vesicular (VSV), el virus de influenza A y el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (Otsuka *et al.*, 2011, Matskevich *et al.*, 2011, Triboulet *et al.*, 2007). Si bien en estos casos el silenciamiento ocurre gracias a DICER y otras proteínas de la familia Argonauta (AGO1 y AGO2), se ha reportado que la proteína NS4B de DENV puede

interferir con la actividad de DICER (Kakumani *et al.*, 2013). Sin embargo, el silenciamiento de genes por la vía de Piwi es independiente de DICER, por lo que sería interesante investigar la presencia de piARN virales en células de mamífero infectadas con el virus dengue, mediante el silenciamiento de PIWI y evaluar si la ausencia de PIWI favorece la susceptibilidad a la infección del virus dengue.

Traducción

DENV utiliza la maquinaria de traducción de la célula para sintetizar sus proteínas. Se encontraron aumentos en expresión de las proteínas ribosomales RPS19 y RPL7, las cuales son parte estructural de los ribosomas, además de tener otras funciones extracelulares de las que se hablara más adelante.

La proteína ribosomal S19 es una proteína de 16kDa y es un componente de la subunidad ribosomal 40S. (Robledo *et al.*, 2006). También posee funciones extracelulares, ya que monómeros de RPS19 se asocian con fosfatidilserina en la membrana plasmática durante la apoptosis, resultando en la formación de oligómeros que se unen al receptor C5a de monocitos y funcionan como un quimio atrayente clásico durante la inflamación (Nishimura *et al.* 2012). Se ha reportado que S19 interactúa con la nucleocápside de Hantavirus, miembro de la familia Bunyaviridae, y sugieren que esta interacción facilita la carga de los ARNm con cap durante la iniciación de la traducción mediada por la nucleocapside del virus (Cheng *et al.*, 2011).

La proteína ribosomal L7 es parte de la subunidad ribosomal 60S. L7 puede unirse a ARNm; el dominio de unión a ARN está representado por un oligopeptido enriquecido en lisinas y argininas, que es capaz de interactuar con el elemento Rev- *responsive* de

VIH tipo I (Hemmerich *et al.*, 1997). Además de formar parte del ribosoma L7 se une al receptor de vitamina D (VDR) en presencia de su ligando para controlar la transcripción de los genes regulados por este receptor (Berghöfer *et al.* 1998). En el contexto de la infección con DENV se ha visto que la vitamina D suprime la replicación de DENV (Puerta *et al.*, 2012) y en pacientes con fiebre del dengue se ha reportado altos niveles de 25-hydroxy vitamina D en comparación con pacientes control sanos (Alagarasu *et al.*, 2012), la vitamina D regula la expresión del receptor de entrada de DENV DC-SIGN (Torres *et al.*, 2010), además se han asociado polimorfismos del VDR con el dengue hemorrágico (Alagarasu *et al.*, 2012).

Una proteína que también aumento su expresión, pero no es parte de los procesos anteriormente mencionados es la sulfatasa extracelular, es una enzima encargada de remover el grupo 6-O-sulfato del heparan sulfato presente en la superficie celular de la mayoría de células animales (Rosen *et al.*, 2010). No se ha reportado que esta enzima esté involucrada en el contexto de una infección viral, sin embargo, se sabe que el heparan sulfato interviene en la entrada del virus a la células (Germi *et al* 2005; Dalrymple *et al* 2011).

Respuesta a estrés oxidativo

Se ha observado la presencia de estrés oxidativo en pacientes con dengue (Soundravally *et al.*, 2008; Seet *et al.*, 2009). En las células infectadas con DENV, el virus podría estar regulando negativamente la expresión de TRPM2 y aconitasa para controlar sus funciones en condiciones de estrés oxidativo, las cuales son muerte

celular e impedir la traducción de genes con elemento de respuesta a hierro, y sería por esta razón que se encuentran disminuidas.

TRPM2 es un canal de cationes permeable a calcio está regulado por a ADP ribosa intracelular. Es activado por estrés celular y confiere susceptibilidad a muerte celular. Se ha visto que inhibir TRPM2 es una medida efectiva para proteger células endoteliales de la muerte celular, ya que la supresión TRPM2 reduce la activación de caspasas 3 y 9 (Sun *et al.*, 2012).

La aconitasa es un enzima que cataliza la isomerización del citrato a isocitrato a través de cis-aconitato en el ciclo de Krebs. Además de esta función enzimática la aconitasa actúa como una proteína de unión a elementos de respuesta a hierro (IRE) regulando la traducción cuando la célula se encuentra en bajas condiciones de hierro o bajo estrés oxidativo. Mientras la aconitasa está unida al IRE el mRNA no puede unirse a la subunidad 40S del ribosoma y por lo tanto no puede traducirse (Beinert *et al.*, 1996). En dengue no se ha observado la relación de la aconitasa con la infección, sin embargo si se ha encontrado una disminución en la expresión de otra enzima del ciclo de Krebs, la succinato dehidrogenasa (Pattanakitsakul *et al.*, 2007). En otros virus como el HCV hay evidencias de la interacción de la aconitasa con proteínas virales de HCV además de la similitud que tiene IRE con el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del genoma viral, lo que supondría que una disminución de la aconitasa deja libre esta región del ARN viral necesaria para el inicio de la traducción (Tumban *et al.*, 2009). Aunque se sabe que DENV no requiere de IRES para su traducción (Edgil *et al.*, 2006).

Un punto importante a considerar es que solo el 16% de las células se encontraban infectadas por lo que no se puede distinguir si estos cambios en la expresión de proteínas ocurrieron en las células infectas o son el efecto de citocinas, como el interferón, sobre las células no infectadas. Como se mencionó anteriormente en las células infectadas las proteínas NS5, NS4B, NS2A y NS4A del DENV modulan la respuesta a interferón, en las en las células sin infectar adyacentes a las células infectadas si hay la respuesta a Interferon debido a que no están expresando las proteínas virales. Las proteínas que cambiaron su expresión se analizaron en la base de datos Interferome (Rusinova et al., 2013), una base de datos de los genes regulados por interferón, se encontró que el gen de la aconitasa y el gen del TRPM2 pueden ser regulados negativamente por la respuesta a Interferón, mientras que puede aumentar la expresión el gen p_{pk}, que fue lo observado en nuestro estudio. Sin embargo se necesitarían hacer más experimentos para determinar si estos cambios son por la respuesta a Interferón. Independientemente de que los cambios observados se produzcan de manera directa en células infectas o indirectamente en las demás células, ambas respuestas son el resultado de la infección con el DENV y es importante estudiarlas a fondo para comprender la patogénesis del dengue.

VIII. CONCLUSIONES

Utilizando la estrategia de marcaje con isótopos estables y espectrometría de masas se identificaron 11 proteínas expresadas diferencialmente en las células Huh7 infectadas con DENV2.

A las 24 h post infección aumentan 8 proteínas involucradas principalmente en el transporte de lípidos (OSBP y APOO), en el silenciamiento de genes por ARNi (PIWIL3), traducción (RPS19 y RPL7) y la vimentina un constituyente estructural del citoesqueleto.

A las 24 h post infección disminuyen tres proteínas, dos de ellas con respuesta a estrés oxidativo (ACON y TRPM2) y la proteína transmembrana 52 no ha sido caracterizada.

IX. PERSPECTIVAS

Corroborar por otras metodologías, como Westernblot o qRT-PCR, que las proteínas encontradas en este trabajo cambian su expresión a las 24 hpi.

Posteriormente, evaluar el papel de éstas proteínas en el contexto de la infección de células Huh7 con el virus dengue. Este análisis se haría usando la metodología de RNA de interferencia. Se espera que la inhibición de la expresión de proteínas involucradas en una respuesta antiviral aumente la infección de DENV, ya sea por copias de genoma viral o progenie. En el caso contrario, si dichas proteínas favorecen la infección al no estar presentes la infección disminuirá.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, C., Budimir, N., Fournier, F., & Tabet, J.-C. (2005). Activated surfaces for laser desorption mass spectrometry: application for peptide and protein analysis. *Current Pharmaceutical Design*, 11(20), 2559–2576.
- Alagarasu, K, Honap, T., Mulay, a P., Bachal, R. V, Shah, P. S., & Cecilia, D. (2012). Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with clinical outcomes of dengue virus infection. *Human immunology*, 73(11), 1194–9.
- Alagarasu, Kalichamy, Bachal, R. V, Bhagat, A. B., Shah, P. S., & Dayaraj, C. (2012). Elevated levels of vitamin D and deficiency of mannose binding lectin in dengue hemorrhagic fever. *Virology journal*, 9, 86.
- Albuquerque, L. M., Trugilho, M. R. O., Chapeaurouge, A., Jurgilas, P. B., Bozza, P. T., Bozza, F. A., Perales, J., *et al.* (2009). Two-dimensional difference gel electrophoresis (DiGE) analysis of plasmas from dengue fever patients. *Journal of Proteome Research*, 8(12), 5431–5441.
- Alcon-LePoder, S., & Drouet, M. (2005). The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. *Journal of ...*, 79(17), 11403–11411.
- Amako, Y., Sarkeshik, A., Hotta, H., Yates, J., & Siddiqui, A. (2009). Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 83(18), 9237–46.
- Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T. S., Verma, A., Milani, M., Owens, R. J., Stuart, D. I., *et al.* (2009). Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *Journal of virology*, 83(24), 12895–906.
- Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhunt, C., Kasinrerk, W., Malasit, P., *et al.* (2007). Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. (M. J. Buchmeier, Ed.) *PLoS Pathogens*, 3(11), 15.
- Barnesiv, J., & Hieftje, G. (2004). Recent advances in detector-array technology for mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 238(1), 33–46.
- Beinert, H., Kennedy, M. C., & Stout, C. D. (1996). Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chemical Reviews*, 96(7), 2335–2374.
- Berghöfer-Hochheimer, Y., Zurek, C., Wölfl, S., Hemmerich, P., & Munder, T. (1998). L7 protein is a coregulator of vitamin D receptor-retinoid X receptor-mediated transactivation. *Journal of cellular biochemistry*, 69(1), 1–12.

- Blackley, S., Kou, Z., Chen, H., Quinn, M., Rose, R. C., Schlesinger, J. J., Coppage, M., *et al.* (2007). Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *Journal of Virology*, *81*(24), 13325–13334.
- Carro, A. C., & Damonte, E. B. (2013). Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. *Virus research*, 1–10.
- CENAVECE. (2012). Panorama Epidemiológico de la Fiebre por dengue y Fiebre Hemorrágica por dengue en entidades federativas. *Secretaría de Salud, Mexico*. Retrieved from http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografia_Dengue_2012.pdf
- Chee, H.-Y., & AbuBakar, S. (2004). Identification of a 48kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry. *Biochemical and biophysical research communications*, *320*(1), 11–7.
- Chen, Y. C., Wang, S. Y., & King, C. C. (1999). Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *Journal of virology*, *73*(4), 2650–7.
- Cheng, E., Haque, A., Rimmer, M. A., Hussein, I. T. M., Sheema, S., Little, A., & Mir, M. a. (2011). Characterization of the Interaction between hantavirus nucleocapsid protein (N) and ribosomal protein S19 (RPS19). *The Journal of biological chemistry*, *286*(13), 11814–24.
- Cheng, H.-J., Lin, C.-F., Lei, H.-Y., Liu, H.-S., Yeh, T.-M., Luo, Y.-H., & Lin, Y.-S. (2009). Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Experimental biology and medicine Maywood NJ*, *234*(1), 63–73.
- Clyde, K., Kyle, J. L., & Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*, *80*(23), 11418–31.
- Conceição, T. M., El-Bacha, T., Villas-Bôas, C. S. a, Coello, G., Ramírez, J., Montero-Lomeli, M., & Da Poian, A. T. (2010). Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *The Journal of infection*, *60*(1), 65–75
- Dalrymple, N., & Mackow, E. R. (2011). Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *Journal of virology*, *85*(18), 9478–85.
- Diamond, M. S., Edgil, D., Roberts, T. G., Lu, B., & Harris, E. (2000). Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains. *Journal of Virology*, *74*(17), 7814–7823.

- Durbin, A. P., Vargas, M. J., Wanionek, K., Hammond, S. N., Gordon, A., Rocha, C., Balmaseda, A., *et al.* (2008). Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*, 376(2), 429–435.
- Edgil, D., Polacek, C., & Harris, E. (2006). Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *Journal of Virology*, 80(6), 2976–2986.
- Ekkapongpisit, M., Wannatung, T., Susantad, T., Triwitayakorn, K., & Smith, D. R. (2007). cDNA-AFLP Analysis of Differential Gene Expression in Human Hepatoma Cells (HepG2) Upon Dengue Virus Infection, 561(December 2006), 552–561.
- Fink, J., Gu, F., Ling, L., Tolfvenstam, T., Olfat, F., Chin, K. C., Aw, P., *et al.* (2007). Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients. (J. Farrar, Ed.) *PLoS neglected tropical diseases*, 1(2), 11.
- Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2011). Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. *Current opinion in microbiology*, 14(4), 470–5.
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology*, 73(7), 6104–6110.
- Gagnon, S. J., Mori, M., Kurane, I., Green, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., *et al.* (2002). Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. *Journal of Medical Virology*, 67(1), 41–46.
- Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J.-P., *et al.* (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, 292(1), 162–8.
- Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 82(2), 373–428.
- Gubler, D J. (2006). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *JNMA J Nepal Med Assoc*, 11(3), I–II.
- Gubler, Duane J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical medicine and health*, 39(4 Suppl), 3–11.
- Guthals, A., & Bandeira, N. (2012). Peptide identification by tandem mass spectrometry with alternate fragmentation modes. *Molecular cellular proteomics MCP*

- Guy, B., Balas, C., Kennel, A., Deauvieau, F., Sodoyer, R., Arnaud-Barbe, N., & Lang, J. (2010). Different innate signatures induced in human mdcs by wild-type dengue 3 virus, attenuated but reactogenic dengue 3 virus, or non-reactogenic attenuated dengue 1-4 vaccine viruses. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 83(5), 248.
- Guzman, M. (2003). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *Journal of Clinical Virology*, 27(1), 1–13.
- Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science New York NY*, 239(4839), 476–81.
- Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., Lacount, D. J., Kuhn, R. J., & Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17345–17350.
- Heaton, N. S., & Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell host microbe*, 8(5), 422–432.
- Heaton, N. S., & Randall, G. (2011). Dengue virus and autophagy. *Viruses*, 3(8), 1332–41.
- Hemmerich, P., Bosbach, S., Von Mikecz, a, & Krawinkel, U. (1997). Human ribosomal protein L7 binds RNA with an alpha-helical arginine-rich and lysine-rich domain. *European journal of biochemistry / FEBS*, 245(3), 549–56.
- Hess, A. M., Prasad, A. N., Ptitsyn, A., Ebel, G. D., Olson, K. E., Barbacioru, C., Monighetti, C., *et al.* (2011). Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiology*, 11(1), 45
- Hilgard, P., & Stockert, R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 32(5), 1069–77.
- Huerre, M. R., Lan, N. T., Marianneau, P., Hue, N. B., Khun, H., Hung, N. T., Khen, N. T., *et al.* (2001). Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Archiv an international journal of pathology*, 438(2), 107–115.
- Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. a, & Hurley, J. H. (2005). Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature*, 437(7055), 154–8.
- Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., & Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(8), 1411–1418.

- Jiang, L., Yao, H., Duan, X., Lu, X., & Liu, Y. (2009). Polypyrimidine tract-binding protein influences negative strand RNA synthesis of dengue virus. *Biochemical and biophysical research communications*, 385(2), 187–92.
- Jones, M., Davidson, A., Hibbert, L., Gruenwald, P., Schlaak, J., Ball, S., Foster, G. R., et al. (2005). Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *Journal of Virology*, 79(9), 5414–5420.
- Kalayanarooj, S., & Nimmannitya, S. (2003). Clinical presentations of dengue hemorrhagic fever in infants compared to children. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet thangphaet*, 86 Suppl 3(SUPPL. 3), S673–S680.
- Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., & Thongboonkerd, V. (2010). The ubiquitin-proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *Journal of Proteome Research*, 9(10), 4960–4971.
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(2), 126–39.
- Kliks, S. C., Nimmanitya, S., Nisalak, A., & Burke, D. S. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(2), 411–419.
- Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., & Smith, D. R. (2010). Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*, 406(1), 149–61.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., et al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717–25.
- Kyle, J. L., Beatty, P. R., & Harris, E. (2007). Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(12), 1808–1817.
- Larreal, Y., Valero, N., Estévez, J., Reyes, I., Maldonado, M., Espina, L. M., Arias, J., et al. (2005). Hepatic alterations in patients with dengue. *Investigacion Clinica*, 46(2), 169–178.
- Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., De Chacon, Ramos, C., et al. (1999). Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, 73(6), 4738–4747.
- Limon-Flores, A. Y., Perez-Tapia, M., Estrada-Garcia, I., Vaughan, G., Escobar-Gutierrez, A., Calderon-Amador, J., Herrera-Rodriguez, S. E., et al. (2005). Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the

- early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *International journal of experimental pathology*, 86(5), 323–34.
- Lin, C.-F., Lei, H.-Y., Shiau, A.-L., Liu, C.-C., Liu, H.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., *et al.* (2003). Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *Journal of Medical Virology*, 69(1), 82–90.
- Lin, Y. L., Liu, C. C., Chuang, J. I., Lei, H. Y., Yeh, T. M., Lin, Y. S., Huang, Y. H., *et al.* (2000). Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology*, 276(1), 114–26.
- Lin, Y. L., Liu, C. C., Lei, H. Y., Yeh, T. M., Lin, Y. S., Chen, R. M., & Liu, H. S. (2000). Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *Journal of medical virology*, 60(4), 425–31.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *Journal of Virology*, 73(6), 4611–4621.
- Lixin, M., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & 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*, 101(10), 3414–3419.
- Marianneau, P., Cardona, a, Edelman, L., Deubel, V., & Desprès, P. (1997). Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *Journal of virology*, 71(4), 3244–9.
- Marovich, M., Grouard-Vogel, G., Louder, M., Eller, M., Sun, W., Wu, S. J., Putvatana, R., *et al.* (2001). Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings the Society for Investigative Dermatology Inc and European Society for Dermatological Research*, 6(3), 219–24.
- Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–581.
- Martínez-Gutierrez, M., Castellanos, J. E., & Gallego-Gómez, J. C. (2011). Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*, 54(4), 202–216.
- Mathew, A., & Rothman, A. L. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews*, 225(1), 300–313.
- Matskevich, A. a, & Moelling, K. (2007). Dicer is involved in protection against influenza A virus infection. *The Journal of general virology*, 88(Pt 10), 2627–35.

- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.-P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., *et al.* (2011). Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Molecular cellular proteomics MCP*, 10(9), M111.011015.
- Miller, J. L., De Wet, B. J. M., deWet, B. J. M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. a, Rudd, P. M., *et al.* (2008). The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS pathogens*, 4(2), e17.
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., & Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *The Journal of biological chemistry*, 282(12), 8873–82.
- Mousley, C. J., Yuan, P., Gaur, N. a, Trettin, K. D., Nile, A. H., Deminoff, S. J., Dewar, B. J., *et al.* (2012). A sterol-binding protein integrates endosomal lipid metabolism with TOR signaling and nitrogen sensing. *Cell*, 148(4), 702–15.
- Munday, D. C., Surtees, R., Emmott, E., Dove, B. K., Digard, P., Barr, J. N., Whitehouse, A., *et al.* (2012). Using SILAC and quantitative proteomics to investigate the interactions between viral and host proteomes. *Proteomics*, 12(4-5), 666–72.
- Muñoz-Jordán, J. L. (2010). Subversion of interferon by dengue virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 338, 35–44.
- Muñoz-Jordán, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., & García-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of Virology*, 79(13), 8004–8013.
- Muñoz-Jordán, J. L., Sánchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., & García-Sastre, A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14333–14338.
- Nasirudeen, A. M. A., Wong, H. H., Thien, P., Xu, S., Lam, K.-P., & Liu, D. X. (2011). RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. (E. Harris, Ed.) *PLoS neglected tropical diseases*, 5(1), 11.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., *et al.* (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Reports*, 4(7), 723–728.
- Ngo, M., & Ridgway, N. (2009). Oxysterol binding protein–related protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates Golgi structure and function. *Molecular biology of the cell*, 20, 1388–1399.

- Nishiura, H. (2013). Complement Therapeutics. In J. D. Lambris, V. M. Holers, & D. Ricklin (Eds.), (Vol. 734, pp. 111–121). Boston, MA: Springer US.
- Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., Kang, Y. J., *et al.* (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*, 27(1), 123–34.
- Pattanakitsakul, S., Rungrojcharoenkit, K., Kanlaya, R., Sinchaikul, S., Noisakran, S., Chen, S., Malasit, P., *et al.* (2007). Proteomic Analysis of Host Responses in HepG2 Cells during Dengue Virus Infection research articles, 4592–4600.
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 369–377.
- Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A. S., Moore, R. J., Weitz, K. W., Pasa-Tolic, L., *et al.* (2012). Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. (M. T. Heise, Ed.) *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002584.
- Perry, R. H., Cooks, R. G., & Noll, R. J. (2008). Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 661–699.
- Puerta-Guardo, H., De la Cruz Hernández, S. I., Rosales, V. H., Ludert, J. E., & Del Angel, R. M. (2012). The 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D3 reduces dengue virus infection in human myelomonocyte (U937) and hepatic (Huh-7) cell lines and cytokine production in the infected monocytes. *Antiviral research*, 94(1), 57–61.
- Puerta-Guardo, H., Mosso, C., Medina, F., Liprandi, F., Ludert, J. E., & Del Angel, R. M. (2010). Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *The Journal of general virology*, 91(Pt 2), 394–403.
- Ramos-Castañeda, J., Imbert, J. L., Barrón, B. L., & Ramos, C. (1997). A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *Journal of neurovirology*, 3(6), 435–40
- Raychaudhuri, S., & Prinz, W. a. (2010). The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 157–77.
- Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., Del Angel, R. M., Valle, J. R., Cha, S., & Angel, R. M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of Virology*, 79(8), 4557–4567.
- Robledo, S., Idol, R. a, Crimmins, D. L., Ladenson, J. H., Mason, P. J., & Bessler, M. (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(9), 1918–29.

- Rodenhuis-Zybert, I. a, Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(16), 2773–86.
- Rosen, S. D., & Lemjabbar-Alaoui, H. (2010). Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(9), 935–949.
- Rothman, A. L. (2004). Review series Dengue : defining protective versus pathologic immunity. *Journal of Clinical Investigation*, 113(7), 946–951.
- Rothwell, C., Lebreton, A., Young Ng, C., Lim, J. Y. H., Liu, W., Vasudevan, S., Labow, M., *et al.* (2009). Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology*, 389(1-2), 8–19.
- Saito, H., Lund-Katz, S., & Phillips, M. C. (2004). Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Progress in lipid research*, 43(4), 350–80.
- Sakoonwatanyoo, P., Boonsanay, V., & Smith, D. R. (2006). Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology*, 49(3), 161–72.
- Seet, R. C. S., Lee, C.-Y. J., Lim, E. C. H., Quek, A. M. L., Yeo, L. L. L., Huang, S.-H., & Halliwell, B. (2009). Oxidative damage in dengue fever. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(4), 375–380.
- Seneviratne, S. L., Malavige, G. N., & De Silva, H. J. (2006). Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(7), 608–14.
- Sessions, O., & Barrows, N. (2009). Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature*, 458(7241), 1047–1050.
- Sessions, O. M., Tan, Y., Goh, K. C., Liu, Y., Tan, P., Rozen, S., & Ooi, E. E. (2013). Host Cell Transcriptome Profile during Wild-Type and Attenuated Dengue Virus Infection. (E. Harris, Ed.) *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2107.
- Siqueira, J. B., Vinhal, L. C., Do Carmo Said, R. F., Hoffmann, J. L., Martins, J., Barbiratto, S. B., & Coelho, G. E. (2011). Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. *MINISTÉRIO DA SAÚDE*. Retrieved June 1, 2013, from http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cap_7_saude_brasil_2010.pdf
- Solomon, T., Dung, N. M., Vaughn, D. W., Kneen, R., Thao, L. T., Raengsakulrach, B., Loan, H. T., *et al.* (2000). Neurological manifestations of dengue virus infection. *Journal of the Neurological Sciences*, 355(9209), 117–122.

- Soundravally, R., Sankar, P., Bobby, Z., & Hoti, S. L. (2008). Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. *Platelets*, 19(6), 447–454.
- Stephenson, J. R. (2005). Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(4), 308–314.
- Suaya, J. A., Shepard, D. S., Siqueira, J. B., Martelli, C. T., Lum, L. C. S., Tan, L. H., Kongsin, S., *et al.* (2009). Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(5), 846–855.
- Sun, L., Yau, H.-Y., Wong, W.-Y., Li, R. a, Huang, Y., & Yao, X. (2012). Role of TRPM2 in H₂O₂-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PloS one*, 7(8), e43186.
- Takaoka, A., & Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cellular microbiology*, 8(6), 907–22.
- Takeuchi, H., Takeuchi, T., Gao, J., Cantley, L. C., & Hirata, M. (2010). Characterization of PDK as a protein involved in epidermal growth factor receptor trafficking. *Molecular and cellular biology*, 30(7), 1689–702.
- Tan, G. K., & Alonso, S. (2009). Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(3), 302–308.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., *et al.* (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(7), 823–829.
- Thepparit, C., Phoolcharoen, W., Suksanpaisan, L., & Smith, D. R. (2004). Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology*, 47(2), 78–86.
- Thepparit, C., & Smith, D. R. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of Virology*, 78(22), 12647–12656.
- Thomas, J. J., Bakhtiar, R., & Siuzdak, G. (2000). Mass spectrometry in viral proteomics. *Accounts of chemical research*, 33(3), 179–87.
- Tio, P. H., Jong, W. W., & Cardoso, M. J. (2005). Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virology Journal*, 2, 25.
- Torres, C., Sánchez De La Torre, M., García-Moruja, C., Carrero, A. J., Trujillo, M. D. M., Fibla, J., & Caruz, A. (2010). Immunophenotype of vitamin D receptor polymorphism associated to risk of HIV-1 infection and rate of disease progression. *Current HIV Research*, 8(6), 487–492.

- Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y. L., Chable-Bessia, C., Bennasser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., *et al.* (2007). Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*, 315(5818), 1579–1582.
- Tumban, E., Painter, J. M., & Lott, W. B. (2009). Comparison between the HCV IRES domain IV RNA structure and the Iron Responsive Element. *Journal of negative results in biomedicine*, 8, 4.
- Vasilakis, N., Deardorff, E. R., Kenney, J. L., Rossi, S. L., Hanley, K. A., & Weaver, S. C. (2009). Mosquitoes Put the Brake on Arbovirus Evolution: Experimental Evolution Reveals Slower Mutation Accumulation in Mosquito Than Vertebrate Cells. (R. Andino, Ed.) *PLoS Pathogens*, 5(6), 18.
- Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2008). *The history and evolution of human dengue emergence. Advances in virus research* (Vol. 72, pp. 1–76). Elsevier Inc.
- Vestal, M. L., & Campbell, J. M. (2005). Tandem time-of-flight mass spectrometer. *Methods in Enzymology*, 65(8), 79–108.
- Walther, T. C., & Mann, M. (2010). Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *The Journal of cell biology*, 190(4), 491–500.
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature reviews Microbiology*, 5(7), 518–28.
- WHO. (2012). Dengue and severe dengue. WHO. Consultado abril 2012. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Wilm, M. (2009). Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics*, 9(20), 4590–4605.
- Winkler, G., Maxwell, S. E., Ruemmler, C., & Stollar, V. (1989). Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*, 171(1), 302–305.
- Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M. K., *et al.* (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*, 6(7), 816–20.
- Wu, W.-C., Liu, H.-W., & Lin, A. (2007). Human ribosomal protein L7 displays an ER binding property and is involved in ribosome-ER association. *FEBS letters*, 581(4), 651–7.
- Yan, Z., Hu, H. Y., Jiang, X., Maierhofer, V., Neb, E., He, L., Hu, Y., *et al.* (2011). Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic Acids Research*, 39(15), 6596–6607.

- Yates, J. R., Ruse, C. I., & Nakorchevsky, A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual review of biomedical engineering*, 11(c), 49–79.
- Yazi Mendoza, M., Salas-Benito, J. S., Lanz-Mendoza, H., Hernández-Martínez, S., & Del Angel, R. M. (2002). A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(1), 76–84.
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., et al. (2007). Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *Journal of Virology*, 81(8), 3891–3903.
- Zheng, J., Sugrue, R. J., & Tang, K. (2011). Mass spectrometry based proteomic studies on viruses and hosts--a review. *Analytica chimica acta*, 702(2), 149–59.

ANEXO 1

TUNE FILE VALUES

Source Type: NSI
Capillary Temp (C): 275.00
APCI Vaporizer Temp (C): 0.00
Sheath Gas Flow (): 0.00
Aux Gas Flow (): 0.00
Sweep Gas Flow (): 0.00
Injection Waveforms: On
Ion Trap Zoom AGC Target: 3000.00
Ion Trap Full AGC Target: 30000.00
Ion Trap SIM AGC Target: 10000.00
Ion Trap MSn AGC Target: 10000.00
FTMS Injection Waveforms: On
FTMS Full AGC Target: 500000.00
FTMS SIM AGC Target: 50000.00
FTMS MSn AGC Target: 50000.00

POSITIVE POLARITY

Source Voltage (kV): 2.20
Source Current (uA): 100.00
S-Lens RF Level (%): 61.00
Skimmer Offset (V): 0.00
Multipole RF Amplifier (Vp-p): 740.00
Multipole 00 Offset (V): -4.00
Lens 0 Voltage (V): -4.20
Multipole 0 Offset (V): -4.50
Lens 1 Voltage (V): -15.00
Gate Lens Offset (V): -90.00
Multipole 1 Offset (V): -8.00
Front Lens (V): -5.25
Ion Trap Zoom Micro Scans: 1
Ion Trap Zoom Max Ion Time (ms): 50.00
Ion Trap Full Micro Scans: 1
Ion Trap Full Max Ion Time (ms): 50.00
Ion Trap SIM Micro Scans: 1
Ion Trap SIM Max Ion Time (ms): 50.00
Ion Trap MSn Micro Scans: 4
Ion Trap MSn Max Ion Time (ms): 800.00
FTMS Full Micro Scans: 1
FTMS Full Max Ion Time (ms): 500.00
FTMS SIM Micro Scans: 1

FTMS SIM Max Ion Time (ms): 50.00
FTMS MSn Micro Scans: 1
FTMS MSn Max Ion Time (ms): 500.00

METODO

Creator: LTQ Velos
Last modified: 11/23/2012 by LTQ Velos

MS Run Time (min): 210.00

Sequence override of method parameters not enabled.

Divert Valve: not used during run

Contact Closure: in use during run

Contact Time (min)	Valve State
0.00	Open
0.03	Closed
0.06	Open

Syringe Pump: not used during run

MS Detector Settings:

Real-time modifications to method disabled

Stepped collision energy not enabled

Additional Microscans:

MS2	0	0
MS3	0	0
MS4	0	0
MS5	0	0
MS6	0	0
MS7	0	0
MS8	0	0
MS9	0	0
MS10	0	0

Segment 1 Information

Duration (min): 0.10
Number of Scan Events: 1
Tune Method: ESITuneIBT04-1

Scan Event Details:

1: ITMS + p norm o(350.0-2000.0)
CV = 0.0V

Lock Masses:

Pos List Name:	N/A
Source:	API Source
Mass List:	(none)
Neg List Name:	N/A
Source:	API Source
Mass List:	(none)

Segment 2 Information

Duration (min): 209.90
Number of Scan Events: 9
Tune Method: ESITuneIBT04-1

Scan Event Details:

- 1: FTMS + c norm res=60000 o(350.0-2000.0)
CV = 0.0V
- 2: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS Most intense ion from (1)
Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 10.000
CV = 0.0V
- 3: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS Most intense ion from (1)
Activation Type: HCD
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Time: 0.100
FT first mass mode: fixed at m/z
FT first mass value: 100.00
CV = 0.0V
- 4: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS 2nd most intense ion from (1)
Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250

- Activation Time: 10.000
CV = 0.0V
- 5: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS 2nd most intense ion from (1)
Activation Type: HCD
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Time: 0.100
FT first mass mode: fixed at m/z
FT first mass value: 100.00
CV = 0.0V
- 6: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS 3rd most intense ion from (1)
Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 10.000
CV = 0.0V
- 7: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS 3rd most intense ion from (1)
Activation Type: HCD
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Time: 0.100
FT first mass mode: fixed at m/z
FT first mass value: 50.00
CV = 0.0V
- 8: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS 4th most intense ion from (1)
Activation Type: CID
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 10.000
CV = 0.0V
- 9: FTMS + c norm res=30000 Dep MS/MS 4th most intense ion from (1)
Activation Type: HCD
Min. Signal Required: 500.0
Isolation Width: 3.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Time: 0.100
FT first mass mode: fixed at m/z

FT first mass value: 50.00
CV = 0.0V

Lock Masses:

Pos List Name:	N/A
Source:	API Source
Mass List:	(none)
Neg List Name:	N/A
Source:	API Source
Mass List:	(none)

Data Dependent Settings:

Use separate polarity settings disabled
Parent Mass List: (none)
Reject Mass List: (none)
Neutral Loss Mass List: (none)
Product Mass List: (none)
Neutral loss in top: 3
Product in top: 3
Most intense if no parent masses found not enabled
Add/subtract mass not enabled
FT master scan preview mode enabled
Charge state screening not enabled
Charge state dependent ETD time not enabled
Monoisotopic precursor selection not enabled
Non-peptide monoisotopic recognition not enabled
Charge state rejection enabled
Unassigned charge states : rejected
Charge state 1 : rejected
Charge state 2 : not rejected
Charge state 3 : not rejected
Charge states 4+ : rejected
Chromatography mode is disabled

Global Data Dependent Settings:

Predict ion injection time enabled
Use global parent and reject mass lists not enabled
Exclude parent mass from data dependent selection not enabled
Exclusion mass width by mass
Exclusion mass width low: 1.50
Exclusion mass width high: 1.50
Parent mass width by mass
Parent mass width low: 0.50
Parent mass width high: 0.50
Reject mass width by mass
Reject mass width low: 0.50
Reject mass width high: 0.50

Zoom/UltraZoom scan mass width by mass
Zoom/UltraZoom scan mass width low: 5.00
Zoom/UltraZoom scan mass width high: 5.00
FT SIM scan mass width low: 5.00
FT SIM scan mass width high: 5.00
Neutral Loss candidates processed by decreasing intensity
Neutral Loss mass width by mass
Neutral Loss mass width low: 0.50
Neutral Loss mass width high: 0.50
Product candidates processed by increasing mass
Product mass width by mass
Product mass width low: 0.50
Product mass width high: 0.50
MS mass range: 0.00-1000000.00
MSn mass range by mass
MSn mass range: 0.00-1000000.00
Use m/z values as masses not enabled
Analog UV data dep. not enabled
Dynamic exclusion enabled
Repeat Count: 1
Repeat Duration: 30.00
Exclusion List Size: 500
Exclusion Duration: 60.00
Exclusion mass width by mass
Exclusion mass width low: 1.50
Exclusion mass width high: 1.50
Expiration: disabled
Isotopic data dependence not enabled
Mass Tags data dependence not enabled

Custom Data Dependent Settings:
Not enabled