



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS miRNAs
miR-30e, miR-99b-5p y miR-16 DE EXOSOMAS
DERIVADOS DE CÉLULAS INFECTADAS CON
DENGUE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS ADRIÁN GONZÁLEZ MONTAÑO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SOFIA LIZETH
ALCARAZ ESTRADA

ASESOR INTERNO: DR. OCTAVIO DANIEL REYES
HERNÁNDEZ



CIUDAD DE MÉXICO

2017



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 es de ustedes,
pero el futuro, por el que
tanto he trabajado, me
pertenece”*

Nikola Tesla.

Agradecimientos

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

A la Dra. Sofia Lizeth Alcaraz Estrada por recibirme en su laboratorio, ser una fuente de inspiración, guía, por brindarme su confianza, apoyo y consejos durante la realización de este proyecto, así como también agradezco sus consejos fuera del área académica.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por su guía, sugerencias y consejos durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Martha Yocupicio Monroy por su apoyo, guía y consejos durante la realización de este trabajo.

Al QFB Carlos Enrique Báez Navarro por todos sus regaños, enseñanzas, consejos, sugerencias y apoyo durante la realización de este proyecto.

A la Bióloga Rosa María Navarrete Ramírez, a la Bióloga Clarisa Estefania Marmolejo Gutiérrez y a Axel Missael Cervantes López por su amistad, apoyo, consejos, enseñanzas, sugerencias y guía durante toda la carrera de Biología así como también durante la realización de este trabajo.

Dedicatorias

A mi madre Julia Flor Montaña Mendoza por todo el apoyo y cariño que ha brindado durante todos estos años. Por ser esa gran mujer que me ha enseñado como seguir adelante. Gracias por todo el esfuerzo que día a día haces, por todo tu apoyo y consejos en todos los proyectos y metas de mi vida. No encuentra la manera de expresar toda mi admiración y agradecimiento que siento por ti, simplemente te agradezco por todo.

A Daniel Cortes Buendía por todo el apoyo que me ha brindado durante todos estos años.

A mi abuela Susana Teresa Mendoza Martínez por apoyarme durante todos estos años y por darme todo su cariño.

Índice

Resumen	I
1. Introducción	1
1.1. <i>Flavivirus</i>	1
1.2. Dengue	1
1.2.1. Epidemiología del virus dengue	3
1.2.2. Proteínas del virus dengue	3
1.2.3. Receptores del virus dengue	4
1.2.4. Ciclo replicativo del virus dengue	5
1.2.4.1. Adhesión y entrada viral	5
1.2.4.2. Traducción y replicación	6
1.2.4.3. Ensamblaje y liberación	6
1.2.5. Virus dengue y la respuesta inmune	7
1.3. Exosomas	8
1.3.1. Biogénesis de exosomas	9
1.3.2. microRNAs de exosomas	10
1.3.3. Funciones de los miRNAs de exosomas	11
1.3.4. miR-30e	12
1.3.5. miR-99b-5p	13
1.3.6. miR-16	13
1.4. Antecedentes	14
2. Justificación	16
3. Hipótesis	17
4. Objetivo general	17
5. Objetivos particulares	17
6. Material y métodos	18
6.1. Preparación del suero para medio de cultivo	18
6.2. Línea celular	18
6.3. Diferenciación de las células U937 DC-SIGN	18
6.4. Infección de células U937 DC-SIGN	19

6.5.	Aislamiento de exosomas por centrifugación diferencial	19
6.6.	Extracción y cuantificación de RNA	20
6.7.	RT-PCR.....	21
6.8.	qPCR	21
6.9.	Análisis estadístico.....	22
6.10.	Análisis de expresión diferencial	23
7.	Resultados	25
7.1.	Selección de blancos moleculares de cada miRNA a evaluar	25
7.2.	hsa-miR-30e-5p	25
7.2.1.	Posibles blancos de unión de hsa-miR-30e-5p.....	26
7.2.2.	qRT-PCR.....	27
7.2.3.	Expresión diferencial de hsa-miR-30e-5p.....	28
7.2.4.	Análisis estadístico	29
7.3.	hsa-miR-99b-5p	31
7.3.1.	Posibles blancos de unión de miR-99b-5p.....	32
7.3.2.	qRT-PCR.....	33
7.3.3.	Expresión diferencial	34
7.3.4.	Análisis estadístico	34
7.4.	hsa-miR-16-5p	37
7.4.1.	Posibles blancos de unión de miR-16-5	37
7.4.2.	qRT-PCR.....	39
7.4.3.	Expresión diferencial	40
7.4.4.	Análisis estadístico	40
8.	Discusión de resultados	44
9.	Conclusiones	50
10.	Perspectivas.....	51
11.	Bibliografía	52

Índice de figuras

Figura 1 Estructura madura del dengue virus	1
Figura 2 Estructura del virus dengue.....	3
Figura 3 Genoma del virus dengue	4
Figura 4 Estructura y composición de un exosoma.....	9
Figura 5 Esquema de la biogénesis de exosomas	10
Figura 6 Esquema de la función dE utilizando la ecuación propuesta	24
Figura 7 Gel de agarosa al 2% del miR-30e	28
Figura 8 Gráfica de la expresión diferencial del miR-30e a través del tiempo	28
Figura 9 Gel de agarosa al 2% del miR-99b-5p.....	33
Figura 10 Gráfica de la expresión diferencial del miR-99b-5p a través del tiempo.....	34
Figura 11 Gel de agarosa al 2% del miR-16	39
Figura 12 Gráfica de la expresión diferencial del miR-16 a través del tiempo	40
Figura 13 Blanco molecular del miR-99b-5p	44
Figura 14 Interacción de los blancos moleculares del miR-99b-5p y el miR-30e-5p	45
Figura 15 Interacción de los blancos moleculares del miR-30e-5p y miR-16-5p	46
Figura 16 Interacción de los blancos moleculares del miR-15-5p y el miR-30e-5p	47
Figura 17 Interacciones de los blancos moleculares de los tres miRNAs.....	48
Figura 18 Esquema ilustrativo del perfil de expresión de los miRNAs durante la infección con DENV2 en exosomas y en la célula.....	49

Índice de tablas

Tabla 1 Condiciones utilizadas para realizar la RT-PCR.....	21
Tabla 2 Condiciones utilizadas para realizar la q-PCR.....	22
Tabla 3 Estructura de horquilla y secuencia madura del miR-30e.....	25
Tabla 4 Posibles blancos de unión del miR-30e.....	26
Tabla 5 Función de los posibles blancos moleculares del miR-30e.....	26
Tabla 6 Resultados de los valores p de los análisis estadísticos de los datos de los Ct's.....	29
Tabla 7 Resultados de los valores p de las pruebas estadísticas.....	30
Tabla 8 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas.....	30
Tabla 9 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas a las 12, 24, 48 y 72 horas.	31
Tabla 10 Estructura de horquilla y secuencia madura del miR-99b-5p.....	32
Tabla 11 Posibles blancos de unión del miR-99b-5p.....	32
Tabla 12 Función del posible blanco molecular del miR-99b-5p.....	33
Tabla 13 Resultados de los valores p de los análisis estadísticos de los datos de los Ct's.....	35
Tabla 14 Resultados de los valores p de las pruebas estadísticas.....	35
Tabla 15 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas.....	36
Tabla 16 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas a las 12, 24, 48 y 72 horas	36
Tabla 17 Estructura de horquilla y secuencia madura del miR-16.....	37
Tabla 18 Posibles blancos de unión del miR-16.....	37
Tabla 19 Función de los posibles blancos moleculares del miR-16-5p.....	38
Tabla 20 Resultados de los valores p de los análisis estadísticos de los datos de los Ct's.....	41
Tabla 21 Resultados de los valores p de las pruebas estadísticas.....	41
Tabla 22 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas.....	42
Tabla 23 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas a las 12, 24, 48 y 72 horas	42

Resumen

En México el virus Dengue (DENV) es endémico y se reporta la circulación de los 4 serotipos (DENV1-4). El DENV es transmitido a través de la picadura de los mosquitos *Aedes*. Los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los principales vectores del virus Dengue.

El dengue es el agente causal de una enfermedad que lleva el mismo nombre, en donde se presenta una fiebre elevada y se acompaña de dos de los siguientes síntomas: dolor de cabeza muy intenso, dolor detrás de los globos oculares, dolores musculares y articulaciones, náuseas, vómito, agrandamiento de ganglios linfáticos o salpullido. El dengue grave es una complicación potencialmente mortal, caracterizada por extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica.

Hasta el momento no son claros los mecanismos moleculares de la enfermedad causada por este DENV. Recientemente se ha explorado el papel de los miRNAs en la regulación de infecciones virales y su función en la infección causada por DENV. El primer reporte del papel de un miRNA en la infección por DENV reveló que el miR-146a, incrementaba la replicación viral en monocitos humanos ya que impedía la respuesta por IFN- β e inhibía TRAF6 (Wu *et al.*, 2013). Recientemente se identificó que let-7c inhibe la infección del DENV posiblemente a través de un mecanismo que activa la respuesta del estrés oxidativo (Escalera-Cueto *et al.*, 2015). Todos estos reportes son de miRNAs intracelulares que se modulan de manera diferencial en respuestas a la infección por el DENV.

En los últimos años los exosomas han recobrado importancia, ya que es una forma de comunicación intercelular en donde se transfieren proteínas, lípidos y RNAs incluyendo mRNAs, miRNAs y otros ncRNAs. Estos RNAs exosómicos pueden ser absorbidos por células vecinas o células distantes cuando los exosomas circulan y posteriormente modulan las células receptoras.

Por ello en el presente trabajo se analizó el posible mecanismo de acción de tres miRNAs durante la infección por DENV serotipo 2 considerando los blancos con los que interactúa cada miRNA. Los tres miRNAs elegidos son el miR-30e el cual se ha reportado durante la infección por DENV, el miR-99b-5p y el miR-16

reportados como específicos de exosomas. También se evaluó la expresión de estos miRNAs en estas vesículas a través del tiempo.

Para el miR-30e los posibles blancos son: TNRC6A, IL-7 y CD80. El posible blanco del miR-99b-5p es el EIF2C2 y para el miR-16 son: CD80, IL-15 y CD28. La expresión del miR-30e sigue una tendencia inhibitoria a través del tiempo mientras que para el miR-99b-5p y el miR-16 la tendencia que siguen es de incremento de la expresión. Dicho estudio sirve como base para el planteamiento de nuevos análisis y estudios donde se pueda establecer un perfil de expresión de todos los miRNAs de exosomas de células infectadas con DENV-2.

1. Introducción

1.1. *Flavivirus*

Los *Flavivirus* pertenecen a la familia *Flaviviridae*, la cual tiene 70 miembros diferentes relacionados antigénicamente. Los *Flavivirus* están envueltos, son virus de RNA de cadena sencilla con un tamaño de partícula de hasta ~50nm de diámetro. La mayoría de los *Flavivirus* son arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). Los arbovirus son transmitidos principalmente a través de garrapatas o picaduras de mosquitos. El virus del Dengue (DENV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus West Nile (WNV), el virus Zika y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) son *Flavivirus* patógenos humanos (Rastogi *et al.*, 2016).

1.2. Dengue

El dengue es una enfermedad causada por un virus de RNA de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*. Existen cuatro serotipos (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4) (WHO, 2016). El virión es caracterizado como una partícula pequeña envuelta (50nm de diámetro) contiene una sola cadena de polaridad de sentido positivo de RNA de aproximadamente 11kb de longitud (Kuadkitkan *et al.*, 2010; Figura 1).

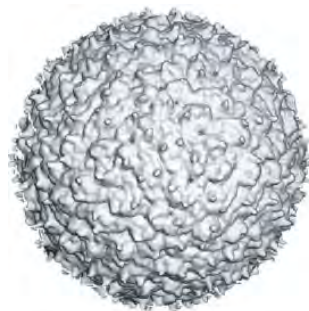


Figura 1 Estructura madura del dengue virus (Perera y Kuhn, 2008).

El virus del dengue es transmitido a través de las picaduras de los mosquitos *Aedes*. Los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los principales vectores del virus dengue (McBurney *et al.*, 2016; WHO, 2016).

DENV es el agente causal de la enfermedad viral más común transmitida por mosquitos en seres humanos y se distribuyen en más de 100 países, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales (Bäck y Lundkvist, 2013; WHO, 2016).

El dengue es una enfermedad con síntomas semejantes a la gripe, en donde se presenta una fiebre elevada (40°C) y se acompaña de dos de los siguientes síntomas: dolor de cabeza muy intenso, dolor detrás de los globos oculares, dolores musculares y articulaciones, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o salpullido. Los síntomas se presentan al cabo de un periodo de incubación de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado (WHO, 2016).

El dengue grave (conocido anteriormente como dengue hemorrágico) es una complicación potencialmente mortal porque cursa con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica (WHO, 2016).

Se cree que la mayoría de las infecciones por dengue son asintomáticas; sin embargo, una porción se manifiesta como una enfermedad febril no específica o progresa a la clásica fiebre por dengue (DF), caracterizada por fiebre y dolor en las articulaciones. Algunas de esas infecciones pueden evolucionar a dengue severo (SD), como dengue hemorrágico (DHF) o síndrome de choque por dengue (DSS) (WHO, 2016; Yam-Puc *et al.*, 2016). La respuesta del anticuerpo (Ab) neutralizante de memoria es uno de los mecanismos más importantes para vencer las reinfecciones homotípicas y heterotípicas con DENV y es por lo tanto el objetivo de las vacunas. Los estudios epidemiológicos clásicos indican que los individuos que tienen una infección secundaria con un serotipo de DENV diferente del primero están en mayor riesgo de desarrollar SD (Yam-Puc *et al.*, 2016). Esto incluye tales circunstancias como los infantes infectados por primera vez, pero que ya tiene maternalmente Ab específicos de DENV (Kliks *et al.*, 1988; Yam-Puc *et al.*, 2016).

1.2.1. Epidemiología del virus dengue

El número real de casos de dengue no está bien notificado y muchos casos están mal clasificados. Según una estimación reciente, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente (Bäck y Lundkvist, 2013; Bhatt et al., 2013; WHO, 2016).

Antes de 1970, solo nueve países habían sufrido epidemias de dengue grave. Sin embargo, ahora la enfermedad es endémica en más de 100 países de las regiones de África, América, el mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. En 2008, en las regiones de América, Asia Sudoriental y Pacífico Occidental se registraron en conjunto más de 1,2 millones de casos, y en 2015, más de 3,2 millones. En fecha reciente el número de casos notificados ha seguido aumentando. En 2015, se notificaron 2,35 millones de casos tan solo en la región de América, de los cuales más de 10,200 casos fueron diagnosticados como dengue grave y provocaron 1,181 defunciones (WHO, 2016).

1.2.2. Proteínas del virus dengue

DENV es un virus relativamente simple, su genoma codifica diez proteínas, incluyendo 3 proteínas estructurales: proteína de envoltura (E), cápside (C), prM que posteriormente dará origen a la formación de la proteína asociada a membrana (M); y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B Y NS5 (Figuras 2 y 3; Bäck y Lundkvist, 2013; Noppakunmongkolchai *et al.*, 2016).

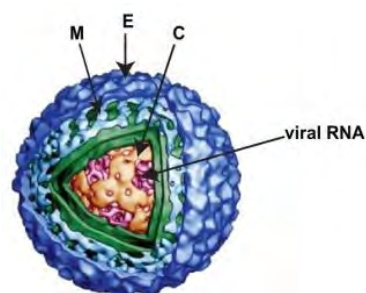


Figura 2 Estructura del virus dengue donde se muestra el virión y las proteínas estructurales (M, E y C) y el RNA viral (Angel y Valle, 2013).

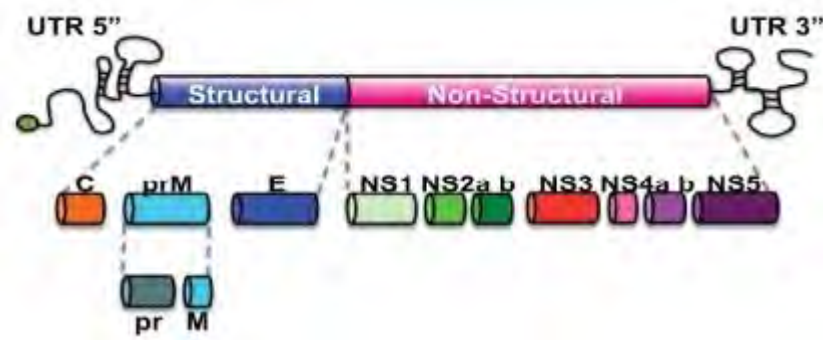


Figura 3 Genoma del virus dengue es un RNA monocatenario de polaridad positiva con un único marco de lectura abierto. Codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales (Angel y Valle, 2013).

1.2.3. Receptores del virus dengue

Para infectar células huésped de insecto, DENV utiliza su proteína E que contiene los componentes responsables de la unión y fusión de células huésped (Klasse *et al.*, 1998), para interactuar con receptores de la célula huésped, seguido por endocitosis mediada por receptores (Acosta *et al.*, 2008; Mosso *et al.*, 2008). Numerosos estudios en células de mamíferos han reportado receptores de superficie celular usados por DENV para facilitar la entrada de células y sugieren que el uso de receptores en células de mamíferos es tanto de tipo celular como de serotipo específico (Cabrera-Hernandez y Smith, 2005; Kuadkitkan *et al.*, 2010).

Las proteínas receptoras de mamíferos son predominantemente proteínas implicadas en cualquier célula mediadora: células de contacto tales como DC-SIGN (Tassaneetrithep *et al.*, 2003) y el receptor de laminina de alta afinidad 37/67 kDa (Thepparit y Smith, 2004) o son proteínas chaperonas tales como HSP70/90 (Reyes-del Valle y del Angel, 2004). En contraste, no se ha identificado ninguna proteína receptora de DENV en insectos, aunque si varias proteínas, predominantemente caracterizadas sólo por peso molecular, han sido implicadas en el proceso de entrada del virus (Kuadkitkan *et al.*, 2010).

1.2.4. Ciclo replicativo del virus dengue

Los diferentes pasos del ciclo replicativo del virus dengue incluyen: 1) los viriones que se unen a moléculas y receptores de unión la superficie celular y se internalizan mediante endocitosis. 2) Debido al bajo pH del endosoma, las glicoproteínas víricas median la fusión de las membranas víricas y celulares permitiendo el desmontaje del virión y la liberación del RNA viral (vRNA) en el citoplasma. 3) El vRNA se traduce en una poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares. 4) Las proteínas virales NS replican el genoma de RNA. 5) El montaje del virus ocurre en la membrana del retículo endoplásmico (ER), donde la proteína C y el vRNA están envueltos por la membrana del ER y glicoproteínas para formar partículas virales inmaduras. 6) Las partículas virales inmaduras son transportadas a través de la vía secretora y en el ambiente ácido de la red trans-Golgi (TGN) la escisión mediada por furina de prM conduce a la maduración del virus. 7) El virus maduro se libera de la célula (Bäck y Lundkvist, 2013).

1.2.4.1. Adhesión y entrada viral

La entrada del virus en la célula se inicia con el acercamiento del DENV a la superficie de la célula, luego la proteína E interactúa con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular que median la unión y la posterior endocitosis del virus (Lindenbach y Rice, 2003; Velandia y Castellanos, 2011). El dominio III de la proteína E interactúa con la proteína de adhesión celular ICAM-3 o DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin, CD209; Tassaneetrithep *et al.*, 2003) o también puede interactuar con el heparán sulfato (Germi *et al.*, 2002). Después de esta interacción, el virus se asocia con un receptor que promueve la endocitosis. Este evento depende de las clatrin. Luego la vesícula endocítica se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío, el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula. El cambio de pH induce los cambios de conformación del dominio II de la proteína E, que favorecen la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la

membrana de la vesícula, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma en donde se libera el genoma viral por un proceso de desnudamiento de la nucleocápside (van der Schaar et al., 2009; Velandia y Castellanos, 2011).

1.2.4.2. Traducción y replicación

El genoma del DENV se traduce como una única poliproteína, que se divide en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Se inicia la traducción por un mecanismo dependiente de cap como el que siguen los RNA mensajeros (mRNA) celulares. Los extremos 3' de los mRNAs tanto víricos como celulares regulan la iniciación de la traducción que procede por mecanismos dependientes de cap o independientes de cap. El ejemplo clásico es la cola 3' poli A que sigue a la región no traducida 3' (3' UTR) en la mayoría de los mRNAs eucariotas y virales (Holden y Harris, 2004; Chiu *et al.*, 2005).

La replicasa de flavivirus se asocia con membranas a través de interacciones que implican las pequeñas proteínas hidrofóbicas NS, vRNA y algunos factores del huésped. La replicación comienza con la síntesis de un RNA de cadena negativa del genoma, que a continuación sirve como una plantilla para la síntesis de RNA de hebra positiva. Se ha detectado RNA de cadena negativa a las 3 horas después de la infección. La síntesis de vRNA es asimétrica, con cadenas positivas acumulándose en un exceso aproximadamente diez veces superior a las cadenas negativas (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.2.4.3. Ensamblaje y liberación

El proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del RNA genómico y la proteína C, sobre esta primera estructura se asocian las proteínas prM/M y E que deben estar inmersas en la membrana del retículo endoplásmico. Posteriormente suceden dos etapas de maduración de la partícula viral. Primero se organizan de forma heterodimérica

las proteínas prM/M y E, donde la primera recubre a la segunda este recubrimiento le confiere un aspecto rugoso. En el segundo paso, esta partícula inmadura transita desde el retículo endoplásmico hasta las regiones *cis* y *trans* del aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración, en esta etapa los cambios de conformación y de rotación de la proteína E generan homotrímeros antiparalelos de la misma, lo que le da una apariencia lisa a la superficie del virus. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM/M por la proteasa furina, independiza el péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de E y mantiene unido al péptido pr. Cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extracitoplásmico induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere la conformación final que puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula sensible e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula (Perera y Kuhn, 2008; Velandia y Castellanos, 2011).

1.2.5. Virus dengue y la respuesta inmune

La respuesta inmune humoral es vital para controlar la infección y diseminación de DENV, la infección con un serotipo proporciona una protección duradera a ese serotipo específico (inmunidad homotípica). La infección subsecuente por otro serotipo da como resultado una protección de corta duración (inmunidad heterotípica), y eventualmente puede ser perjudicial y aumentar el riesgo de dengue grave. Se cree que la naturaleza transitoria de la inmunidad heterotípica se debe a la reactividad cruzada de anticuerpos específicos de la proteína E los cuales son protectores por encima de cierto umbral de concentración (Whitehorn y Simmons, 2011; Bäck y Lundkvist, 2013).

Además de la respuesta inmune humoral, la respuesta inmune celular también es crucial en la patogénesis del DENV. El DENV puede infectar tanto a las células T CD4+ y CD8+. Las células T específicas de DENV responden con un conjunto de diversas funciones efectoras, incluyendo proliferación, lisis de células blanco y la producción de citocinas. Las células CD4+ producen IFN γ , TNF α , TNF β , interleucina 2 (IL-2) y el ligando CC-quimiocina 4 (CCL4 también

conocido como MIPI β) los cuales pueden contribuir a la patogénesis (Gagnon *et al.*, 1999; Bäck y Lundkvist, 2013). La producción de T helper tipo 2 citocinas Th2, como la IL-4 es menos común. En las infecciones no complicadas de DENV, relativamente más células T CD8+ están presentes dando como resultado concentraciones más bajas de IFN γ y TNF α . El papel de las células T reguladoras no está claro en el dengue, pero hay un estudio que sugiere que son funcionales y se expanden en la infección aguda por DENV (Lühn *et al.*, 2007; Bäck y Lundkvist, 2013).

1.3. Exosomas

Los exosomas son vesículas de membrana de bicapa lipídica con un tamaño de 30-100nm, con una densidad de 1.13-1.19 g/mL, secretados por prácticamente todos los tipos de células y formados durante la maduración de los endosomas tras la invaginación y brotación de la membrana limitante de los endosomas tardíos como vesículas intraluminales (ILVs) de cuerpos multivesiculares (MVBs). Los exosomas se observaron por primera vez a principios de 1980 en medios de cultivo de reticulocitos (Johnstone *et al.*, 1987; Chahar *et al.*, 2015).

Los exosomas son liberados por casi todos los tipos celulares y también se han confirmado en todos los fluidos corporales tales como sangre, orina, saliva, leche materna, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico (Chahar *et al.*, 2015).

En los últimos años los exosomas han surgido como una herramienta importante para la comunicación intercelular a través de la transferencia de proteínas, lípidos y RNAs (Meckes y Raab-Traub, 2011; Chahar *et al.*, 2015). La administración extracelular mediada por exosomas de ácidos nucleicos y proteínas entre las células infectadas por virus y no infectados han demostrado jugar un papel importante en la patogénesis viral y en el control de la respuesta inmune del huésped a la infección (Pegtel *et al.*, 2010; Chahar *et al.*, 2015; Figura 4).

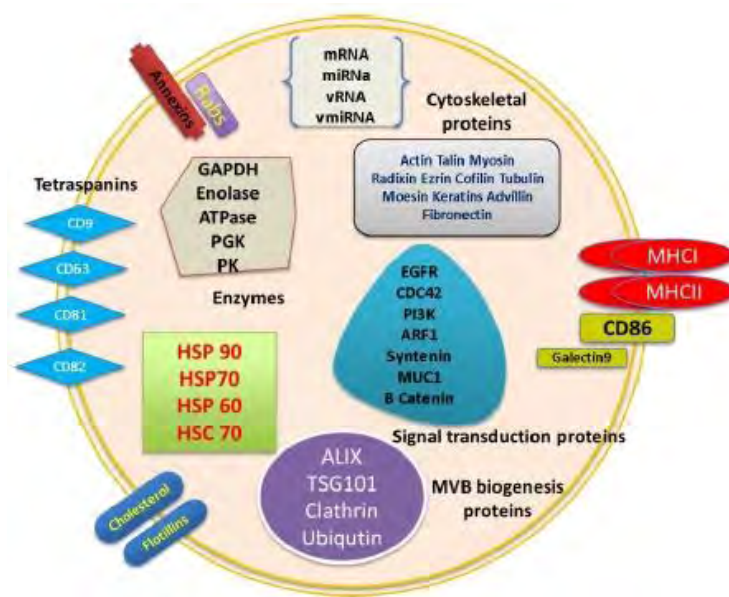


Figura 4 Estructura y composición de un exosoma, la composición depende del tipo célula, estado de salud del huésped y estímulos extracelulares (Chahar *et al.*, 2015).

1.3.1. Biogénesis de exosomas

La biogénesis de los exosomas comienza con la endocitosis y la formación de endosomas tempranos. El endosoma temprano se desarrolla dentro del endosoma tardío durante la maduración, que se caracteriza por la formación de vesículas intraluminales (ILV) dentro del lumen del endosoma. Los ILVs, de 30-100nm de diámetro, se forman por la brotación interior de la membrana endosomal, engullendo al azar porciones del citosol e incorporando transmembrana y proteínas periféricas dentro de la membrana; esto conduce a la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs) (Keller *et al.*, 2006; Chahar *et al.*, 2015; Figura 5).

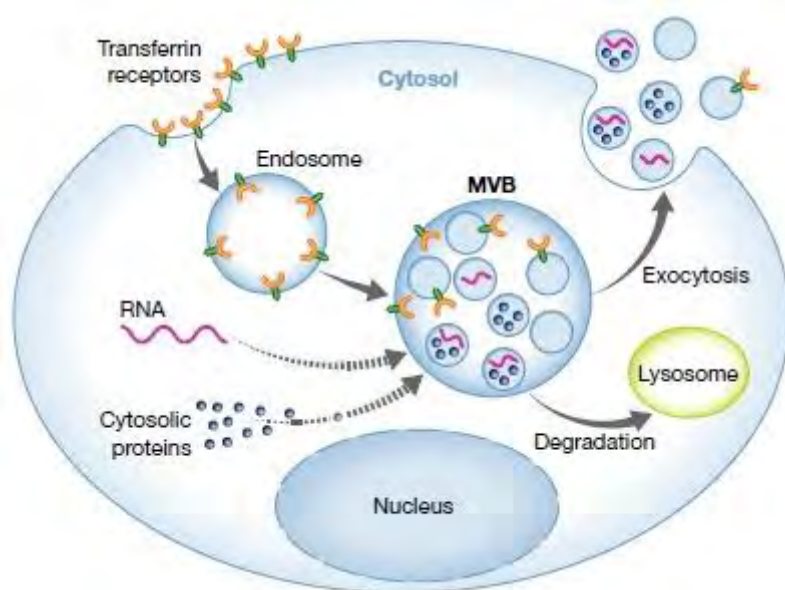


Figura 5 Esquema de la biogénesis de exosomas (Schorey et al., 2014)

Aunque la endocitosis y el tráfico de receptores de membrana plasmática dentro de los MVBs es responsable de su degradación tras la fusión con lisosomas (el destino de los MVBs puede variar y no todos los MVBs se degradan en los lisosomas) los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática dando como resultado la generación de exosomas. El proceso de biogénesis de los exosomas no se entiende bien y muchos estudios sugieren que los mecanismos de biogénesis de exosomas pueden ser específicos de la célula (Perez-Hernandez *et al.*, 2013; Chahar *et al.*, 2015).

En la generación de los exosomas se han reportado varios mecanismos, entre ellos se encuentra uno dependiente de ESCRT (del inglés endosomal sorting complexes required for transport) (Babst *et al.*, 2002). Otro mecanismo dependiente de la síntesis de ceramidas (Stuffers *et al.*, 2009) y uno dependiente de CD63, una tetrasparina característica de exosomas, que es indispensable para la formación de vesículas internas (van Niel *et al.*, 2011).

1.3.2. microRNAs de exosomas

Además de las proteínas, recientemente se han identificado diversos ácidos nucleicos en el lumen exosomal, incluyendo mRNAs, microRNAs (miRNAs) y

otros RNAs no codificantes (ncRNAs) (Sato-Kuwabara *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Estos RNAs exosómicos pueden ser absorbidos por células vecinas o células distantes cuando los exosomas circulan y posteriormente modulan las células receptoras (Zhang *et al.*, 2015).

Los miRNAs son una clase pequeña de 17-24 nucleótidos, RNAs no codificantes, que median el silenciamiento génico post-transcriptional por la unión a la región 3' no traducible (UTR) o al marco de lectura abierto (ORF) región de mRNAs blanco (Bartel 2004). La participación de miRNAs en muchas actividades biológicas ha sido documentada, incluyendo proliferación celular, diferenciación celular, migración, inicio de la enfermedad y progresión de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2015).

1.3.3. Funciones de los miRNAs de exosomas

Los miRNAs en los exosomas liberados por células pueden circular con los vehículos asociados para alcanzar células vecinas y células distantes. Después de ser entregados en las células receptoras, los miRNAs exosomales juegan un rol funcional. Aunque es difícil excluir completamente los efectos de otras cargas exosomales en las células receptoras, los miRNAs se consideran los elementos funcionales clave (Zhang *et al.*, 2015).

Hasta el momento no son claros los mecanismos moleculares de la enfermedad causada por este DENV. A este respecto, recientemente se ha explorado el papel de miRNAs en la regulación de infecciones virales y su función en la infección causada por el DENV. El primer reporte del papel de un miRNA en la infección por el DENV reveló que el miR-146a, incrementaba la replicación viral en monocitos humanos ya que impedía la respuesta por IFN- β e inhibía TRAF6 (Wu *et al.*, 2013). Recientemente se identificó que let-7c inhibe la infección del DENV posiblemente a través de un mecanismo que activa la respuesta del estrés oxidativo (Escalera-Cueto *et al.*, 2015). Todos estos reportes son de miRNAs intracelulares que se modulan de manera diferencial en respuestas a la infección por el DENV.

Los miRNAs se encuentran de manera intracelular y extracelular asociados a proteínas o dentro de vesículas, específicamente exosomas, lo que impide su degradación y les da estabilidad en estos ambientes biológicos. Dentro del cargamento de los exosomas, los miRNAs atraen mucha atención porque se ha demostrado su función regulatoria en la expresión genética, el contenido de miRNAs presentes en los exosomas difiere (Valadi *et al.*, 2007; Taylor y Gercel-Taylor, 2008) e incluso es mayor en comparación con las células parentales (Goldie *et al.*, 2014), lo que finalmente sugiere que existe un mecanismo activo de selección del cargamento molecular de los exosomas.

Las funciones de los miRNAs derivados de exosomas se pueden clasificar en dos tipos, la primera es la función convencional en donde las miRNAs regulan de manera negativa y confieren cambios característicos en los niveles de expresión de los genes blancos y la segunda es una función novedosa que se ha identificado en los miRNAs derivados de exosomas y no en miRNAs intracelulares. Estos miRNAs actúan como ligandos de receptores tipo toll (TLR) que activan a las células inmunes desencadenando una respuesta inflamatoria mediada por TLR (Fabbri *et al.*, 2012).

Dentro de los miRNAs reportados para DV se encuentra el miR-30e (Zhu *et al.*, 2014) y el mir-99b-5p (Huang *et al.*, 2013) y un miRNA reportado como específico de exosomas es el miR-16. Estos miRNAs son de gran interés para nosotros por lo que queremos evaluar su expresión en estas vesículas a través del tiempo.

1.3.4. miR-30e

El estudio realizado por Zhu y colaboradores en el 2014 mostraron que los miRNAs contribuyen a un repertorio de interacciones huésped-patógeno durante la infección viral. El estudio demostró que el miR-30e* dirigido directamente a la región 3'-UTR de I κ B α , perturbando así el loop de retroalimentación negativa de NF- κ B/I κ B α , lo que conduce a la hiperactivación de NF- κ B. Este estudio investigó el posible papel del miR-30e* en la regulación de la inmunidad innata asociada con la infección por el virus dengue. Se encontró que la infección por DENV podría inducir la expresión del miR-30e* en células permisivas a DENV, y tal

sobreexpresión del miR-30e* regulado por IFN- β y los genes IFN-estimulados (ISGs) tales como *OAS1*, *MxA* e *IFITM1* y suprimiendo la replicación del DENV. Además, la supresión de I κ B α media el efecto potenciador del miR-30e* sobre la respuesta antiviral inducida por IFN- β . Sus hallazgos sugieren un papel modulador del miR-30e* en DENV inducida por IFN- β señalización a través de la vía dependiente NF- κ B. Concluyendo que se necesita investigación adicional para evaluar si el miR-30e* tiene un efecto anti-DENV *in vivo*.

1.3.5. miR-99b-5p

El estudio realizado por Huang y colaboradores en 2013 demostró que una gran variedad de especies de RNA están incrustadas en las vesículas circulantes. Se aplicó secuenciación profunda para describir y caracterizar perfiles de RNAs exosómicos derivados de plasma. El análisis de secuencias mostró que había una colección diversa de las especies de RNA exosomal entre los cuales los miRNAs fueron los más abundantes, constituyendo más del 42.32% de todas las lecturas en bruto y 76,20% de todas las lecturas asignables. 593 miRNAs fueron detectables. Los cinco miRNAs más comunes fueron el miR-99a-5p, miR-128, miR-124-3p, miR-22-3p y el miR-99b-5p los cuales representaron colectivamente el 48,99% de todas las secuencias de miRNAs. El análisis de enriquecimiento de genes blanco de los miRNAs sugiere que los miRNAs pueden desempeñar un papel importante en las funciones biológicas, tales como la fosforilación de proteínas, RNA splicing, anomalías cromosómicas y angiogénesis.

1.3.6. miR-16

El miR-16 está presente en exosomas de las líneas celulares de cáncer de pulmón A-549 y SK-MES. Fabbri y colaboradores en el 2012 realizaron un análisis de NanoString donde se observó que nueve miRNAs (miR-16, -21, -27b, -29a, -133a, -193a-3p, -544, -563 y -1283) estaban presentes en los exosomas derivados de ambas líneas celulares aun nivel de expresión superior a 50 recuento de códigos.

1.4. Antecedentes

Existe una gran reactividad cruzada entre los serotipos de DENV en las pruebas serológicas, existe una limitada inmunidad de protección cruzada en los seres humanos, y una persona puede tener múltiples infecciones con diferentes serotipos durante su vida (Stephenson 2005). Las personas expuestas a infecciones secundarias por DENV se enfrentan a un mayor riesgo de enfermedad grave, lo que indica que la inmunidad cruzada preexistente puede exacerbar la enfermedad (Kraus *et al.*, 2007).

Kraus y colaboradores en el 2007 desarrollaron un ensayo de neutralización de DENV basado en citometría de flujo de 96 pocillos utilizando células Vero (clones 81) o células U937 transfectadas con DC-SIGN, un conocido factor de unión para DENV. El porcentaje de células U937 infectadas en presencia de DC-SIGN se dividió por el porcentaje de células de control (U937 sin DC-SIGN) infectadas, se encontró que las células que expresaban DC-SIGN eran 10 veces o más susceptibles a infección con los cuatro serotipos de DENV. Los ensayos de neutralización basados en citometría de flujo con células Vero y células U937 que expresan DC-SIGN dieron resultados comparables, lo que indica que las propiedades de DENV neutralización de los sueros de referencia no se vieron afectados por el uso de células humanas o no humanas en el ensayo.

El DC-SIGN es una proteína transmembrana de tipo II que se expresa abundantemente en células dendríticas inmaduras. Es una lectina de tipo C con un dominio extracelular que se une a la manosa que contiene carbohidratos con alta afinidad. DC-SIGN participa en la migración de células dendríticas, en el reconocimiento y presentación de antígenos (Geijtenbeek y Van Kooyk, 2003). La molécula DC-SIGN también se identificó como un factor celular requerido para la infección productiva de células dendríticas inmaduras por el virus dengue (Tassaneeritthep *et al.*, 2003). Esta interacción parece ser a través de los grupos de N-glicano de manosa localizada en la glicoproteína E. Aunque esta proteína es glicosilada en dos sitios, Asn67 y Asn153, se cree que el primero se une a DC-SIGN (Mondotte *et al.*, 2007; De La Guardia y Lleonart, 2014).

Un estudio realizado por Shah y colaboradores en el 2013 mostró que la interacción principal entre la glicoproteína E y DC-SIGN se produce por la formación de enlaces de hidrógeno entre la molécula de manosa unida a Asn67 y Asn272 de DC-SIGN y seis puentes salinos presentes en diferentes residuos de aminoácidos de ambas moléculas. El bloqueo del sitio de glicosilación de la glicoproteína E ASn67 y los residuos conservados en la interfase DC-SIGN-DENV podrían afectar la infectividad de todos los serotipos del DENV (Shah *et al.*, 2013; De la Guardia y Leonart, 2014).

En relación con los exosomas y los miRNAS citó dos trabajos realizados por el Q.F.B. Ruiz Jiménez Fernando y el Q.F.B. Baez Navarro Carlos Enrique, los cuales pertenecen a nuestro grupo de trabajo.

En el 2015 en la tesis de maestría del Q.F.B. Ruiz Jiménez Fernando se utilizó como modelo de estudio la línea celular U937-DC-SIGN infectada con DENV2, algunos de resultados son: el aislamiento de exosomas derivados de células U937-DC-SIGN de células no infectadas e infectadas con DENV, se identificaron los marcadores clásicos CD81 y CD63, se detectó un incremento de 137 veces en el miRNA Let-7c en los exosomas de células infectadas con DENV respecto a las células no infectadas y se detectó una disminución de 0.67 veces en el miR-155 en los exosomas de células infectadas respecto a las no infectadas con DENV.

En el trabajo de tesis de licenciatura de Baez Navarro Carlos Enrique en el 2016, se analizaron tres miRNAs derivados de exosomas de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV serotipo 2, en donde se sugiere que el miR-146a-5p podría afectar a la expresión de SRSF6, TRAF6 e IRAK1, lo que podría llevar a un decaimiento en la expresión de INF- β , IL-6 e IL-12. Para el miR-29c-3p podría interactuar con HDAC4, lo que probablemente podría favorecer la expresión de IL-6, IL-8 e IL-12 y para Let-7e-5p podría intervenir en la traducción de CCL3, reduciendo su liberación.

2. Justificación

Con base en las evidencias antes mencionadas se sugiere que la transferencia de vesículas extracelulares es un mecanismo de comunicación intercelular. Se transfieren biomoléculas efectoras como mRNA, miRNAs, DNA, proteínas y lípidos. De los diferentes subtipos vesiculares extracelulares no se ha reportado el contenido molecular de los exosomas derivados de las células infectadas por el virus dengue, así como su papel en la infección por dicho virus. Por ello, en el presente trabajo se analizará y validará la expresión de los miRNAs miR-30e, miR-99b-5p y miR-16 derivados de exosomas de las células U937-DC-SIGN infectadas con el virus dengue.

3. Hipótesis

Existe una expresión diferencial de los miRNAs miR-30e, miR-99b-5p y miR-16 de exosomas secretados de las células U937-DC-SIGN infectadas con el virus dengue.

4. Objetivo general

Validar la expresión de los miRNAs miR-30e, miR-99b-5p y miR-16 de exosomas secretados por las células U937-DC-SIGN infectadas y no infectadas con el virus dengue.

5. Objetivos particulares

- Aislar exosomas derivados de las células U937-DC-SIGN infectadas y no infectadas con el virus dengue.
- Purificar RNA de exosomas de células U937-DC-SIGN infectadas y no infectadas con el virus dengue.
- Analizar la expresión de los miRNAs miR-30e, miR-99b-5p y miR-16 de exosomas derivados de células infectadas y no infectadas con dengue a través del tiempo.

6. Material y métodos

6.1. Preparación del suero para medio de cultivo

Se requiere eliminar los exosomas presentes en el suero fetal bovino (SFB) el cual fue utilizado en el medio de cultivo de las células U937. Para ello, el suero una vez inactivado se centrifugó a 110,000 x g por 2 horas a 4°C. La pastilla de exosomas del suero fue eliminada y posteriormente se filtró utilizando un filtro de 0.22 µm para eliminar toda partícula de tamaño mayor de 200nm, se realizaron alícuotas de 50mL y se almacenaron a -20°C hasta que fue utilizado para preparar medio de cultivo completo sin exosomas. El medio de cultivo RPMI completo se preparó con RPMI Advance, SFB 5%, penicilina/estreptomicina 2x, glutamina 2x y fungizona (anfotericina B).

6.2. Línea celular

La línea celular U937 presenta el receptor DC-SIGN, se desarrolló mediante la transducción de células U937 con el gen para DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin) humano, un conocido factor de unión para el DENV: El vector de clonación utilizado fue pcDNA3 que contiene regiones promotoras de SV-40 y CMV (ATCC <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-3253.aspx#characteristics>). Las células U937 DC-SIGN se crecieron a 37°C en una incubadora con 5% CO₂, en medio RPMI completo.

6.3. Diferenciación de las células U937 DC-SIGN

Se indujo la diferenciación de 10⁶ células U937 DC-SIGN en una multiplaca de 12 pozos con medio de diferenciación que contenía 1:10 000 de PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato) y medio RPMI completo, por 48h.

6.4. Infección de células U937 DC-SIGN

Se realizó la infección de las células U937 DC-SIGN, previamente diferenciadas con PMA, a una multiplicidad de infección MOI (del inglés multiplicity of infection) de 1 considerando el 70% de supervivencia de células. Las células se infectaron con DENV-2.

Se realizó una infección Mock utilizando las células U937 DC-SIGN previamente diferenciadas con PMA que se les agregó cerebro de ratones neonatos inoculados con solución de Hanks.

La infección se realizó a una MOI de 1. A cada pozo de la multiplaca con células diferenciadas se les agregará 500µL del virus o de Mock. Se agitó por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 1.5mL de medio de diferenciación y se agitó dos minutos más. Se dejó la multiplaca en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se colectó el medio de las células infectadas con DENV-2 así como también se colectó el medio de las células de la simulación de la infección Mock de acuerdo al tiempo a evaluar. Los cuatro tiempos a evaluar fueron a las 12, 24, 48 y 72 horas post-infección o post-simulación de la infección según sea el caso.

6.5. Aislamiento de exosomas por centrifugación diferencial

El medio de cultivo de las células infectadas y Mock previamente colectado a las 12, 24, 48 y 72 horas se centrifugó a 2,000 x g durante 20 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorf 5810R con un rotor F45-30-11. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 12,200 x g durante 40 minutos a 4°C se utilizó una centrifuga Eppendorf 5810R con un rotor F45-30-11. Se recolectó aproximadamente el 90% del sobrenadante descartando el contenido del fondo del tubo. El sobrenadante recolectado se filtró por presión en un filtro de 0.22 µm y finalmente las muestras filtradas se sometieron a ultracentrifugación. Se usó una ultracentrifuga Optima™ L-100 XP con un rotor Beckman SM4Ti a 120,000 x g durante 1 hora 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante dejando aproximadamente 1mL de cada muestra en el tubo. A cada muestra se le

adicionó 500µL del reactivo Total Exosome Isolation (from cell culture media) de Invitrogen™ y se dejó incubando toda la noche en refrigeración (2-8°C).

Posteriormente a la incubación las muestras se centrifugaron a 10,000 x g por 1 hora a 4°C utilizando una centrifuga Eppendorf 5810R con un rotor F45-30-11. Se decantó el sobrenadante procurando dejar los botones de exosomas de cada muestra en el tubo y posteriormente cada botón se resuspendió en 50µL de PBS.

6.6. Extracción y cuantificación de RNA

Se utilizó el método de extracción basado en el procedimiento de TRIzol® reagent y el uso de columnas de purificación combinando ambas metodologías. Primero se adicionaron 3 volúmenes de TRIzol® (150µL) a cada muestra de exosomas previamente aislados y resuspendidos en 50µL de PBS, se mezcló en vórtex por un minuto y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se adicionó un tercio de volumen de etanol absoluto (67µL) a cada muestra y se mezcló en vórtex por un minuto, se decantó el contenido de cada tubo en una columna de separación por cada muestra. Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 segundos en una centrifuga Eppendorf mini spin con un rotor F-45-12-11. Al filtrado de cada muestra se le adicionó 133µL de etanol absoluto (2/3 del volumen original de la muestra con TRIzol®) después se mezcló en vórtex por un minuto y posteriormente se colocó en una nueva columna de filtrado y se centrifugó a 12,000 rpm en una centrifuga Eppendorf mini spin con un rotor F-45-12-11 por 15 segundos y posteriormente a la centrifugación se descartó el filtrado final.

Cada columna de separación se lavó dos veces con 500µL de Buffer de lavado (WB) centrifugando a 12,000 rpm por 30 segundos en una centrifuga Eppendorf mini spin con un rotor F-45-12-11. Para secar las muestras se centrifugaron los filtros a 12,000 rpm en la misma centrifuga durante un minuto. Posteriormente se eluyeron las muestras adicionando 30µL de agua DEPC para cada columna y se centrifugó a 12,000 rpm por un minuto. Se juntaron ambos filtrados correspondientes a la misma muestra, teniendo como volumen final 60µL por muestra. Se cuantificó el contenido de RNA de cada muestra en un NanoDrop utilizando como blanco agua DEPC.

6.7. RT-PCR

Se usó el método indicado en el manual del fabricante del kit para qRT-PCR TaqMan™ MicroRNA de Applied Biosystems. Se tomó en consideración las concentraciones de RNA de cada muestra para utilizar la misma cantidad de RNA extraído de los exosomas de células infectadas y Mock, teniendo en cuenta un volumen de 4.575µL de agua DEPC con muestra de RNA. Se utilizó 1 mM de dNTP, buffer de retrotranscripción a una concentración de 1X, 25 U de retrotranscriptasa y 2 U de inhibidor de RNAsas, por cada primer 5X de miRNA a evaluar, diluido a 1X, para tener un volumen final de 7.5µL por cada muestra de 12, 24, 48 y 72 horas de Mock o infección. Se utilizó un control negativo, utilizando 4.575µL de agua DEPC en lugar de muestra. Se utilizó un termociclador T100™ de BIO-RAD utilizando las siguientes condiciones:

Tabla 1 Condiciones utilizadas para realizar la RT-PCR

Tiempo	Temperatura
30'	16°C
30'	42°C
5'	85°C
∞	4°C

6.8. qPCR

Se utilizaron las indicaciones del kit para qRT-PCR TaqMan™ MicroRNA de Applied Biosystems, se consideró usar 5.0µL de TaqMan Master Mix, 2.5µL de agua DEPC, 2.0µL de cDNA producto de la RT-PCR y 0.5 µL de sonda 20X de cada miRNA a evaluar diluida a 1X, teniendo un volumen final de 10µL por cada reacción. Cada sonda se evaluó por triplicado y por cada muestra de cDNA también se utilizó el producto RT-PCR del control negativo. Se usó un termociclador en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System utilizando las siguientes condiciones:

Tabla 2 Condiciones utilizadas para realizar la q-PCR

Tiempo	Temperatura	Ciclos
2'	50°C	1
10'	95°C	
15''	95°C	55
60''	60°C	

6.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 20, en donde se probó si el comportamiento de los datos de Ct registrados durante la qRT-PCR de los grupos a evaluar (Células infectadas y Mock) obedecen una distribución normal, para ello se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con simulación de Monte Carlo (confianza 95% y 10000 muestras). Con base al resultado se realizó la prueba correspondiente para comparar Rangos (U de Mann-Whitney) si la distribución de los valores no sigue una distribución normal ($p < 0.05$). Se comparó medias (t de Student para muestras no relacionadas) si las distribuciones obedecen la tendencia de una distribución normal ($p > 0.05$). Ambas pruebas consideran que las muestras analizadas no están relacionadas entre sí por tratarse de sistemas diferentes uno de infección y otra de simulación de infección y con la finalidad de poder establecer si la diferencia de expresión con base en los Ct's era significativa entre las células infectadas con DENV-2 y las células de simulación de infección Mock.

Se analizó la igualdad de varianzas entre los valores de diferencia de expresión a cada tiempo, con la finalidad de identificar si había homocedasticidad entre las muestras o no, para poder realizar la prueba pertinente que permita comparar si hay una relación entre el tiempo y la diferencia de expresión de cada miRNA en las células infectadas respecto al Mock, es decir, determinar la H de Kruskal-

Wallis, con simulación de Monte Carlo (confianza 95% y 10000 muestras) si se asume heterocedasticidad o ANOVA de un factor si se asume homocedasticidad.

6.10. Análisis de expresión diferencial

Para realizar el análisis de expresión diferencial se utilizó un modelo matemático que permitiera comparar la relación de Ct de cada muestra analizada con su respectivo Mock, dicho modelo se planteó para que fuese fácil de expresar gráficamente el comportamiento o tendencia de los datos analizados.

Partiendo de la diferencia de expresión (dE) se analizó por la relación entre el valor de Ct para el cultivo de infectado (Ct_I) y el valor del cultivo Mock (Ct_M) para cada miRNA, con base en ello se estableció la siguiente ecuación:

$$dE = \frac{Ct_I}{Ct_M}$$

Expresando la cantidad de veces que los Ct del cultivo infectado, se encuentran respecto a los Ct del cultivo Mock, sin embargo, la ecuación no permite analizar la diferencia de expresión en términos de n veces por encima o por debajo de la expresión con respecto al Mock para ello se consideró los supuestos:

- a) $Ct \propto \frac{1}{[cDNA]}$ entre más cDNA haya al inicio de la reacción más rápido se superará la lectura de fondo y se identificará la fluorescencia propia de la amplificación
- b) $dE > 1$ indicaría inhibición de la expresión, $Ct_I > Ct_M$
- c) $dE = 1$ indicaría expresión igual o no alterada, $Ct_I = Ct_M$
- d) $0 < dE < 1$ indicaría sobreexpresión del miRNA, $Ct_I < Ct_M$
- e) $dE = 0$ indicaría ausencia de expresión del miRNA en el cultivo infectado
- f) Cuando $Ct_M \rightarrow 0$ o $dE \rightarrow \infty$ la lectura de la amplificación pudo haberse realizado correctamente por errores sistemáticos.

Partiendo del supuesto c la ecuación es la siguiente:

$$dE = \frac{Ct_I}{Ct_M} - 1$$

Permitiendo contrarrestar la presencia del valor 1 como expresión no alterada y a su vez ajustarlo como línea basal de comparación gráfica. Partiendo del supuesto a y con base al comportamiento gráfico que se deseaba ejemplificar, donde los valores de sobreexpresión se agruparan por encima del eje basal en el que la expresión en las células infectadas fuera la misma que en el Mock y los valores que indicaran inhibición, se agrupasen por debajo del eje basal, la ecuación es la siguiente:

$$dE = -\left(\frac{Ct_I}{Ct_M} - 1\right)$$

Dicha ecuación fue empleada para determinar la diferencia de expresión de los miRNAs con una finalidad de análisis cualitativo debido a que los Ct representan una amplificación con significado exponencial y no son directamente relacionables con la concentración de DNA inicial si no posee una curva de calibración. El siguiente esquema muestra cómo se analizaron los Ct de acuerdo a la ecuación anterior:

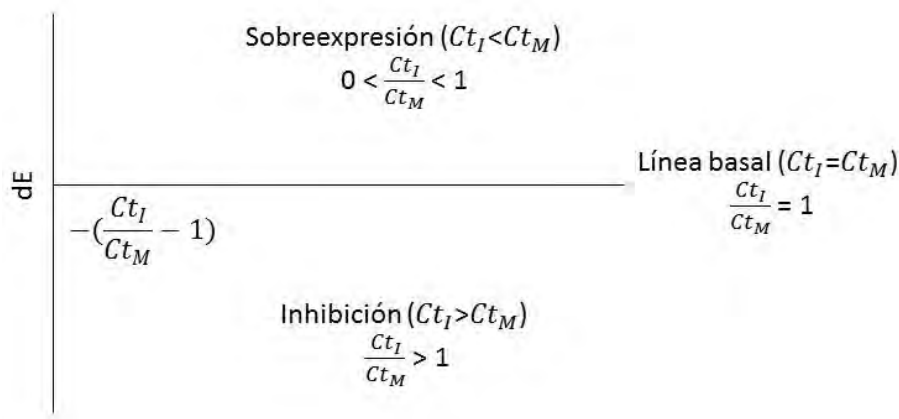


Figura 6 Esquema de la función dE utilizando la ecuación propuesta

7. Resultados

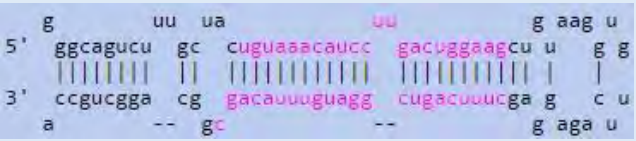
7.1. Selección de blancos moleculares de cada miRNA a evaluar

Se eligieron tres miRNAs [hsa-miR-30e-5p (ID 2223), hsa-miR-99b-5p (ID 436) y hsa-miR-16-5p (ID 391)] para analizar su variabilidad en la expresión durante la infección con el virus dengue, así como también relacionarlos con su liberación dentro de exosomas y las posibles vías en que se cree pueden estar relacionados por unión a blancos específicos como los mRNAs, estas posibles vías probablemente pueden favorecer la propagación del virus o pueden tener el efecto contrario evitando la infección. Los posibles blancos de unión de cada uno de los miRNAs se seleccionaron por su importancia en procesos inmunes que posiblemente pueden estar relacionados durante la infección con el virus dengue, así como el posible cambio de la expresión de estos tres miRNAs durante la liberación de exosomas. Se utilizaron las bases de datos microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) y miRDB (<http://www.mirdb.org/>) para seleccionar los blancos moleculares de cada miRNA.

7.2. hsa-miR-30e-5p

La tabla 3 muestra la estructura de horquilla del hsa-miR-30e y también se encuentra la secuencia madura del hsa-miR-30e-5p.

Tabla 3 Estructura de horquilla y secuencia madura del miR-30e

Estructura de horquilla	Secuencia madura
	17- UGUAAACAUCUUG ACUGGAAG -38

7.2.1. Posibles blancos de unión de hsa-miR-30e-5p

En la tabla 4 se muestran los posibles blancos de unión del hsa-miR-30e-5p en donde se muestran las interacciones predichas.

Tabla 4 Posibles blancos de unión del miR-30e

Posibles blancos de unión	Interacciones predichas
TNRC6A	<pre> 3' gaaGGUCAGUUCUACAAAUGu 5' hsa-miR-30e ; 442:5' gucCCAGU-GUCA AUGUUUACu 3' TNRC6A </pre>
IL7	<pre> 3' gaaggucAGUUCUACAAAUGu 5' hsa-miR-30e 295:5' auacuuUCAAACCGUUUAaa 3' IL7 </pre>
CD80	<pre> 3' gaaggucaguucCUACAAAUGu 5' hsa-miR-30e 495:5' agauuuuauugcuGCUGUUUACa 3' CD80 </pre>

En la tabla 5 se describe la función de cada uno de los posibles blancos moleculares del miR-30e. La información que se muestra en esta tabla fue obtenida de la página web NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

Tabla 5 Función de los posibles blancos moleculares del miR-30e

Posibles blancos de unión	Función
TNRC6A	Este gen codifica un miembro de la repetición trinucleotídica que contiene 6 familias de proteínas. La proteína funciona en silenciamiento de genes post-transcripcional a través de las vías de RNAi y miRNA. La proteína se asocia con RNA mensajero y proteínas Argonata en cuerpos citoplasmáticos conocidos como

	<p>cuerpos GW o cuerpos P. La expresión inhibitoria de este gen delocaliza otras proteínas del cuerpo GW y perjudica el silenciamiento génico inducido por RNAi y miRNA.</p>
IL7	<p>La proteína codificada por este gen es una citocina importante para el desarrollo de células B y T. esta citocina y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) forman un heterodímero que funciona como un factor estimulador del crecimiento de células pre-pro-B. Esta citocina es un factor para el reordenamiento V(D)J del receptor beta de células T (TCRB) durante el desarrollo temprano de las células T. Esta citocina puede producirse localmente por células intestinales epiteliales y de glóbulos epiteliales y puede servir como un factor regulador para los linfocitos de la mucosa intestinal. Estudios Knockout en ratones sugieren que esta citocina juega un papel esencial en la supervivencia de células linfoides. El empalme alternativo da como resultado múltiples variantes de transcripción que codifican distintas isoformas.</p>
CD80	<p>La proteína codificada por este gen es un receptor de membrana que es activado por la unión CD28 o CTLA-4. La proteína activada induce la proliferación de células T y la producción de citocinas. Esta proteína puede actuar como un receptor para el subgrupo B de adenovirus.</p>

7.2.2. qRT-PCR

Para corroborar que la amplificación del miRNA si se llevó a cabo, se decidió hacer un gel de agarosa al 2% en donde se corrieron las muestra productos de la qRT-PCR. En la figura 7 se muestra el gel de agarosa en donde se corrieron los productos finales de DENV y Mock a las 24,48 y 72 horas del miR-30e.

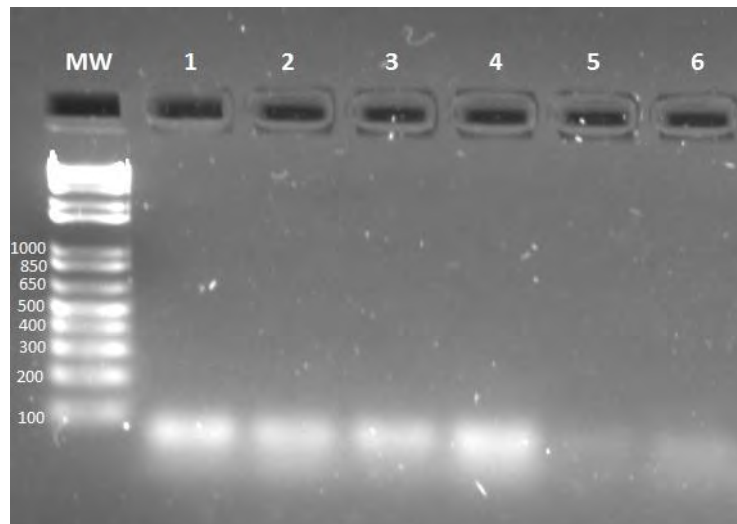


Figura 7 Gel de agarosa al 2%. 1) DENV 24h, 2) Mock 24h, 3) DENV 48h, 4) Mock 48h, 5) DENV 72h y 6) Mock 72h.

7.2.3. Expresión diferencial de hsa-miR-30e-5p

En la figura 8 se observa la expresión diferencial del hsa-miR-30e-5p en donde se pueden observar valores negativos lo que representa una tendencia hacia la inhibición del miRNA conforme al tiempo.

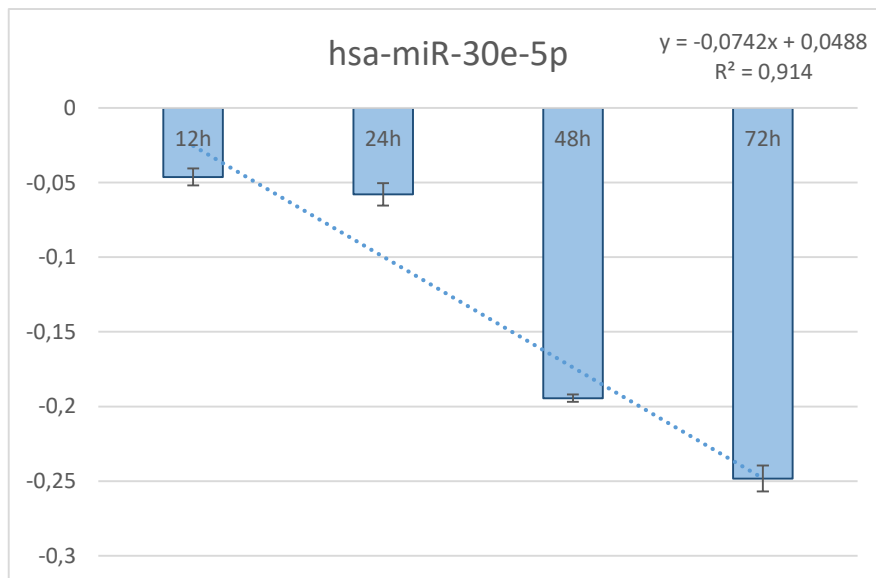


Figura 8 Gráfica de la expresión diferencial del miR-30e a través del tiempo

7.2.4. Análisis estadístico

Se buscó comparar si el comportamiento en cuanto a la distribución de los datos de los Ct's observados en la infección y en el Mock obedecían una distribución normal o no.

$$H_0: F(Ct)=F_0(X) \text{ si } p \geq 0.05 \text{ y } H_a: F(Ct) \neq F_0(X) \text{ si } p < 0.05$$

Con ello se decidió el tratamiento estadístico que se le daría a los mismos valores para demostrar si había una diferencia estadística significativa entre los Ct's del Mock e infectados. Se realizó la prueba Posterior al análisis los valores de Ct's se trataron con la prueba t de Student para muestras no relacionadas, para comparar medias con los siguientes supuestos:

$$H_0: \overline{Ct_I} = \overline{Ct_M} \text{ si } p \geq 0.05 \text{ y } H_a: \overline{Ct_I} \neq \overline{Ct_M} \text{ si } p < 0.05$$

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Resultados de los valores p de los análisis estadísticos de los datos de los Ct's.

Muestra	Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de la prueba t de Student
Infección	0,654	0,000
Mock	0,266	

Se realizó el análisis de los valores dE siguiendo el anterior procedimiento. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar los siguientes supuestos: $H_0: F(dE)=F_0(X)$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: F(dE) \neq F_0(X)$ si $p < 0.05$. Por medio de un análisis de varianzas se determinó la homocedasticidad de los valores observados con $H_0: S_{dE12h}=S_{dE24h}=S_{dE48h}=S_{dE72h}$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: S_{dE12h} \neq S_{dE24h} \neq S_{dE48h} \neq S_{dE72h}$ si $p < 0.05$. Posteriormente se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con los siguientes supuestos: H_0 : Los rangos de valores de dE

son iguales entre sí a los diferentes tiempos evaluados si $p \geq 0.05$ y H_a : Hay al menos una diferencia entre los rangos de valores de dE a diferente tiempo si $p < 0.05$.

Los resultados de las pruebas anteriores se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Resultados de los valores p de las pruebas estadísticas

Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de la prueba ANOVA	Valor de p de la prueba de Kruskal-Wallis
0,141	0,000	0,02

Posteriormente se realizaron los mismos análisis para los valores de Ct's de manera individual, los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas

Muestra	Valor de p de la prueba de ANOVA	Valor de p de la prueba de Kruskal-Wallis
Infección	0,000	0,010
Mock	0,000	0,029

En la tabla 9 se muestran los valores de p para las pruebas de kolmogorov-Smirnov y t de Student a las 12, 24, 48 y 72 horas del Mock y de la infección.

Tabla 9 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas a las 12, 24, 48 y 72 horas

Tiempo	Muestra	Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de la prueba t de Student
12h	Infección	0,906	0,014
	Mock	0,986	
24h	Infección	0,793	0,034
	Mock	0,587	
48h	Infección	0,964	0,000
	Mock	0,839	
72h	Infección	0,725	0,000
	Mock	0,498	

El hsa-miR-30e-5p muestra una diferencia significativa en todos los tiempos evaluados, a las 12h con $p=0.014$, 24h con $p=0,034$, 48h con $p=0.000$ y a las 72h con $p=0.000$.

7.3. hsa-miR-99b-5p

En la tabla 10 se muestra la estructura de horquilla del miR-99b y también se encuentra la secuencia madura del miR-99b-5p.

Tabla 10 Estructura de horquilla y secuencia madura del miR-99b-5p

Estructura de horquilla	Secuencia madura
	7- CACCCGUAGAACCG ACCUUGCG -28

7.3.1. Posibles blancos de unión de miR-99b-5p

Los posibles blancos de unión del miR-99b-5p de enlistan en la tabla 11. También se puede observar las interacciones predichas entre el blanco y el miR-99b-5p.

Tabla 11 Posibles blancos de unión del miR-99b-5p

Posibles blancos de unión	Interacciones predichas
EIF2C2	

En la tabla 12 se describe la función de cada uno de los posibles blancos moleculares del miR-99b-5p. La información que se muestra en esta tabla fue obtenida de la página web NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

Tabla 12 Función del posible blanco molecular del miR-99b-5p

Posibles blancos de unión	Función
EIF2C2	Este gen codifica una proteína miembro de la familia Argonauta que juegan un papel en la interferencia de RNA. La proteína codificada es altamente básica y contiene un dominio PAZ y un dominio PIWI. Puede interactuar con dicer1 y desempeñar un papel en el siRNA mediando el silenciamiento de genes. Se han encontrado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen.

7.3.2. qRT-PCR

Se realizó un electroforesis en gel de agarosa al 2% para corroborar que la amplificación del miRNA si se llevó a cabo, para ello se corrieron las muestras producto de la qRT-PCR en dicho gel los resultados se pueden observar en la figura 9.

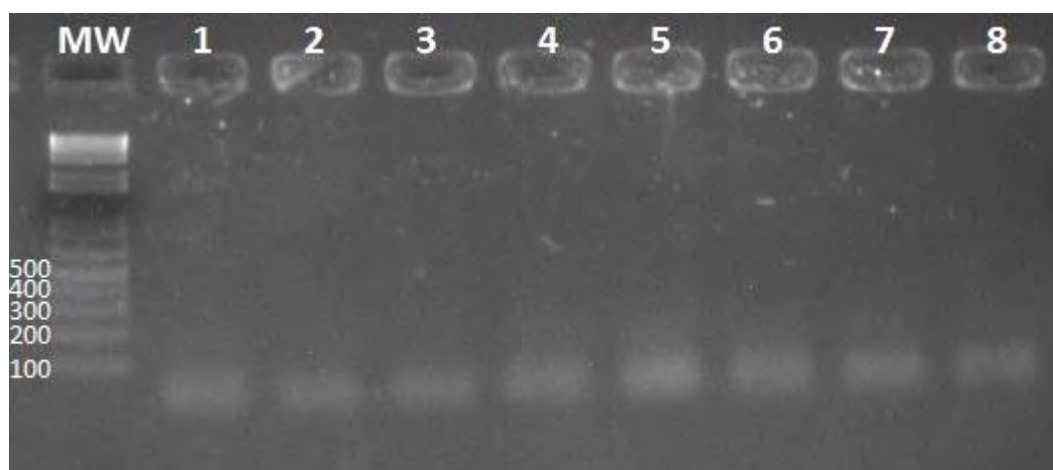


Figura 9 Gel de agarosa al 2%. 1) DENV 12h, 2) Mock 12h, 3) DENV 24h, 4) Mock 24h, 5) DENV 48h, 6) Mock 48h, 7) DENV 72h y 8) Mock 48h

7.3.3. Expresión diferencial

La diferencia de expresión del miR-99b-5p a través del tiempo se puede observar en la figura 10. En el miR-99b-5p se puede observar una tendencia de expresión a través del tiempo.

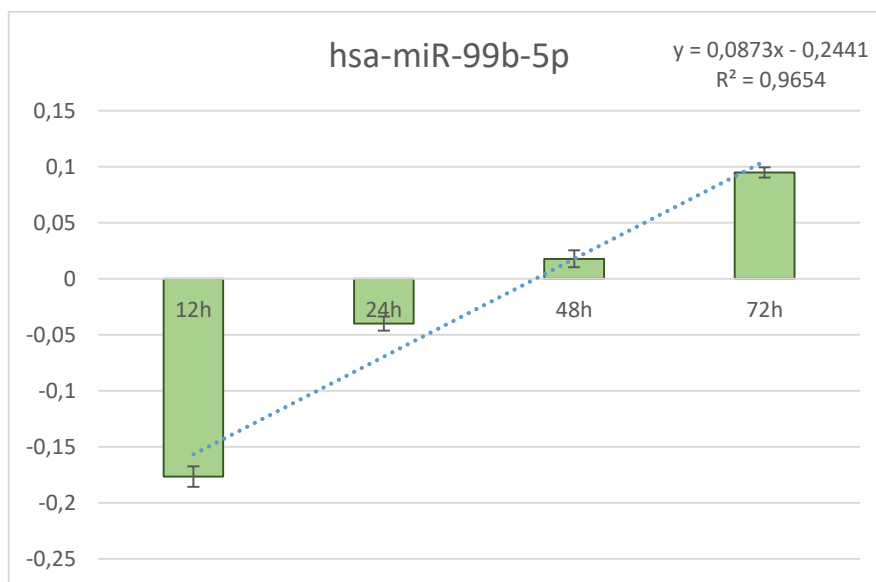


Figura 10 Gráfica de la expresión diferencial del miR-99b-5p a través del tiempo.

7.3.4. Análisis estadístico

Se buscó comparar si el comportamiento en cuanto a la distribución de los datos de los Ct's observados en la infección y en el Mock obedecían una distribución normal o no. $H_0: F(Ct) = F_0(X)$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: F(Ct) \neq F_0(X)$ si $p < 0.05$. Con ello se decidió el tratamiento estadístico que se le daría a los mismos valores para demostrar si había una diferencia estadística significativa entre los Ct's del Mock e infectados.

Se realizó la prueba posterior al análisis los valores de Ct's se trataron con la prueba t de Student para muestras no relacionadas, para comparar medias con los siguientes supuestos: $H_0: \overline{Ct}_I = \overline{Ct}_M$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: \overline{Ct}_I \neq \overline{Ct}_M$ si $p < 0.05$. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13 Resultados de los valores p de los análisis estadísticos de los datos de los Ct's.

Muestra	Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de la prueba t de Student
Infección	0,392	0,666
Mock	0,292	

Se realizó el análisis de los valores dE siguiendo el anterior procedimiento. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar los siguientes supuestos: $H_0: F(dE)=F_0(X)$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: F(dE) \neq F_0(X)$ si $p < 0.05$. Por medio de un análisis de varianzas se determinó la homocedasticidad de los valores observados con $H_0: S_{dE12h}=S_{dE24h}=S_{dE48h}=S_{dE72h}$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: S_{dE12h} \neq S_{dE24h} \neq S_{dE48h} \neq S_{dE72h}$ si $p < 0.05$. Posteriormente se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con los siguientes supuestos: H_0 : Los rangos de valores de dE son iguales entre sí a los diferentes tiempos evaluados si $p \geq 0.05$ y H_a : Hay al menos una diferencia entre los rangos de valores de dE a diferente tiempo si $p < 0.05$. Los resultados de las pruebas anteriores se muestran en la tabla 14.

Tabla 14 Resultados de los valores p de las pruebas estadísticas

Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de prueba ANOVA	Valor de p de la prueba de Kruskal-Wallis
0,787	0,000	0,005

Posteriormente se realizaron los mismos análisis para los valores de Ct's de manera individual, los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas

Muestra	Valor de p de la prueba ANOVA	Valor de p de la prueba de Kruskal-Wallis
Infección	0,279	0,088
Mock	0,021	0,031

En la tabla 16 se muestran los valores de p para las pruebas de kolmogorov-Smirnov y t de Student a las 12, 24, 48 y 72 horas del Mock y de la infección.

Tabla 16 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas a las 12, 24, 48 y 72 horas

Tiempo	Muestra	Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de la prueba t de Student
12h	Infección	0,665	0,028
	Mock	0,779	
24h	Infección	0,692	0,089
	Mock	0,662	
48h	Infección	0,999	0,430
	Mock	0,999	
72h	Infección	0,380	0,323
	Mock	0,428	

El hsa-miR-99b-5p tiene una diferencia significativa a las 12h con una $p=0.028$ pero no presenta diferencias a las 24h ($p=0.089$), 48h ($p=0.430$) ni a las 72 h ($p=0.325$) lo que puede implicar que a partir de las 48h la expresión comienza a ser semejante tanto en las células infectadas con DENV-2 como en el Mock.

7.4. hsa-miR-16-5p

La estructura de horquilla del miR-16 se puede observar en la tabla 17 en donde también se presenta la secuencia madura del miR-16-5p.

Tabla 17 Estructura de horquilla y secuencia madura del miR-16

Estructura de horquilla	Secuencia madura
<pre> ag c - a c u gauu 5' gucagc ugc uuagcagcac gu aaauugg g uaa c 3' caguug aug agucgucgug ca uuaugacc c auu u ga a u a u u aaaa </pre>	14- UAGCAGCACGUAAA UAUUGGCG -35

7.4.1. Posibles blancos de unión de miR-16-5

En la tabla 18 se enlistan los posibles blancos de unión del miR-16-5 y también se puede observar las interacciones predichas con los blancos de unión.

Tabla 18 Posibles blancos de unión del miR-16

Posibles blancos de unión	Interacciones predichas
CD80	<pre> 3' gggguuuuuuuuuUGCAGCACGAu 5' hsa-miR-16 407:5' uaugucaggcaAAGUGCUGCUg 3' CD80 </pre>

IL15	<pre> 3' gcGGUUAUAAAUGCACGACGAu 5' hsa-miR-16 : 36:5' aaCAAACAUCACUCUGCUGCUu 3' IL15 3' gogguuauaaaugcaCGACGAu 5' hsa-miR-16 444:5' ouuacggoguuccagGCUGCUg 3' IL15 3' gcGGUUAUA-AAUGCACGACGAu 5' hsa-miR-16 191:5' uuCCAUCAUGUCCAUGCUGCUg 3' IL15 </pre>
CD28	<pre> 3' gogguuauaaaugcaCGACGAu 5' hsa-miR-16 1523:5' aaaacucugggcucaGCUGCUc 3' CD28 3' gogguuauaaaugcaCGACGAu 5' hsa-miR-16 216:5' gacaaagaugcucagGCUGCUc 3' CD28 </pre>

En la tabla 19 se describe la función de cada uno de los posibles blancos moleculares del miR-16-5p. La información que se muestra en esta tabla fue obtenida de la página web NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

Tabla 19 Función de los posibles blancos moleculares del miR-16-5p

Posibles blancos de unión	Función
CD80	<p>La proteína codificada por este gen es un receptor de membrana que es activado por la unión CD28 o CTLA-4. La proteína activada induce la proliferación de células T y la producción de citoquinas. Esta proteína puede actuar como un receptor para el subgrupo B de adenovirus.</p>

IL15	La proteína codificada por este gen es una citocina que regula T y la activación y proliferación de NK. Esta citocina y la IL-2 comparten muchas actividades biológicas. Se unen a las subunidades comunes del receptor de hematopoyetina y pueden competir por el mismo receptor, y por lo tanto, regular negativamente la actividad de cada uno. Se ha demostrado que el número de células de memoria CD8+ se controla mediante un equilibrio entre esta citocina e IL-2. Esta citocina induce la activación de las quinasas JAK, así como la fosforilación y activación de los activadores de la transcripción STAT3, STAT5 y STAT6.
CD28	La proteína codificada por este gen es esencial para la proliferación y supervivencia de las células T, la producción de citocinas y el desarrollo de células T cooperadoras tipo 2.

7.4.2. qRT-PCR

En la figura 11 se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras producto de la qRT-PCR. Este gel se realizó para corroborar la amplificación del miRNA en las muestras de DENV y Mock.

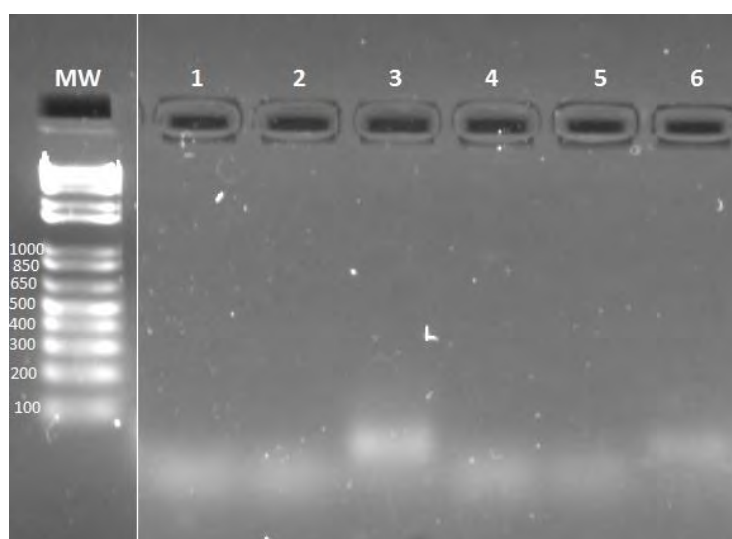


Figura 11 Gel de agarosa al 2%. 1) DENV 24h, 2) Mock 24h, 3) DENV 48h, 4) Mock 48h, 5) DENV 72h y 6) Mock 72h.

7.4.3. Expresión diferencial

La diferencia de expresión del miR-16-5p se puede observar en la figura 12, en dicha gráfica se puede notar la tendencia de la expresión la cual es a expresarse con forma avanza el tiempo.

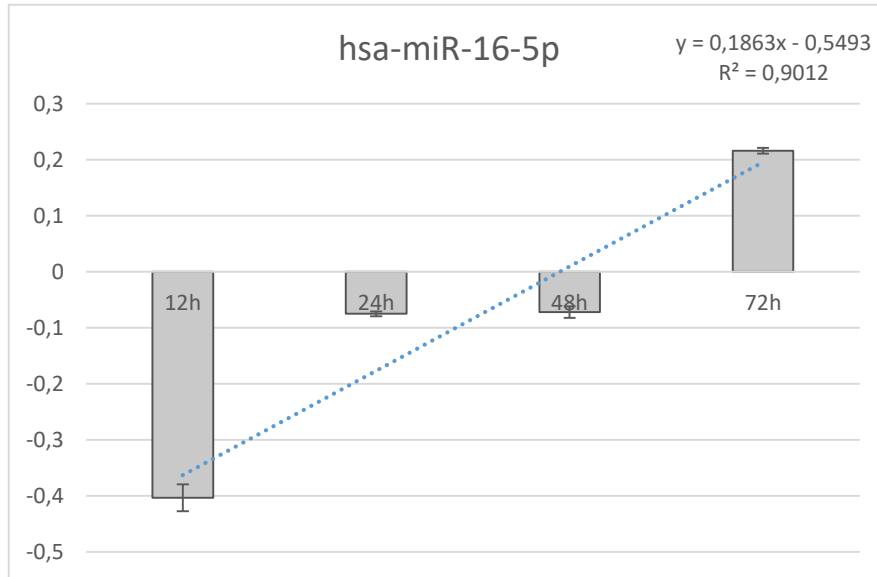


Figura 12 Gráfica de la expresión diferencial del miR-16 a través del tiempo

7.4.4. Análisis estadístico

Se buscó comparar si el comportamiento en cuanto a la distribución de los datos de los Ct's observados en la infección y en el Mock obedecían una distribución normal o no siguiendo los siguientes supuestos: $H_0: F(Ct) = F_0(X)$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: F(Ct) \neq F_0(X)$ si $p < 0.05$. Con ello se decidió el tratamiento estadístico que se le daría a los mismos valores para demostrar si había una diferencia estadística significativa entre los Ct's del Mock e infectados. Se realizó la prueba Posterior al análisis los valores de Ct's se trataron con la prueba t de Student para muestras no relacionadas, para comparar medias con los siguientes supuestos: $H_0: \overline{Ct}_I = \overline{Ct}_M$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: \overline{Ct}_I \neq \overline{Ct}_M$ si $p < 0.05$.

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 20.

Tabla 20 Resultados de los valores p de los análisis estadísticos de los datos de los Ct's.

Muestra	Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de la prueba t de Student
Infección	0,979	0,374
Mock	0,596	

Se realizó el análisis de los valores dE siguiendo el anterior procedimiento. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar los siguientes supuestos: $H_0: F(dE)=F_0(X)$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: F(dE) \neq F_0(X)$ si $p < 0.05$. Por medio de un análisis de varianzas se determinó la homocedasticidad de los valores observados con $H_0: S_{dE12h}=S_{dE24h}=S_{dE48h}=S_{dE72h}$ si $p \geq 0.05$ y $H_a: S_{dE12h} \neq S_{dE24h} \neq S_{dE48h} \neq S_{dE72h}$ si $p < 0.05$. Posteriormente se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con los siguientes supuestos: H_0 : Los rangos de valores de dE son iguales entre sí a los diferentes tiempos evaluados si $p \geq 0.05$ y H_a : Hay al menos una diferencia entre los rangos de valores de dE a diferente tiempo si $p < 0.05$. Los resultados de las pruebas anteriores se muestran en la tabla 21.

Tabla 21 Resultados de los valores p de las pruebas estadísticas

Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de prueba ANOVA	Valor de p de la prueba de Kruskal-Wallis
0,166	0,000	0,013

Posteriormente se realizaron los mismos análisis para los valores de Ct's de manera individual, los resultados se muestran en la tabla 22.

Tabla 22 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas

Muestra	Valor de p de la prueba ANOVA	Valor de p de la prueba de Kruskal-Wallis
Infección	0,003	0,012
Mock	0,000	0,005

En la tabla 23 se muestran los valores de p para las pruebas de kolmogorov-Smirnov y t de Student a las 12, 24, 48 y 72 horas del Mock y de la infección.

Tabla 23 Resultados de los valores de p de las pruebas estadísticas a las 12, 24, 48 y 72 horas

Tiempo	Muestra	Valor de p de la prueba de Kolmogorov-Smirnov	Valor de p de la prueba t de Student
12h	Infección	0,887	0,000
	Mock	0,726	
24h	Infección	0,683	0,221
	Mock	0,547	
48h	Infección	0,651	0,027
	Mock	0,522	

72h	Infección	0,789	0,000
	Mock	0,964	

Para el hsa-miR-16-5p presenta diferencias significativas a las 12h ($p=0.000$), a las 48h ($p=0.027$) y a las 72h ($p=0.000$) pero no hay diferencias a las 24h ($p=0.221$).

8. Discusión de resultados

Los valores de Ct's observados para el hsa-miR-30e-5p es significativamente diferente entre las células infectadas y el Mock con $p=0.000$. Para el hsa-miR-99b-5p con una $p=0.666$ y el hsa-miR-16-5p con una $p=0.374$ no presentaron una diferencia significativa en sus valores de Ct's con respecto al Mock. Se puede observar una diferencia significativa en los tres miRNAs evaluados a las 12h.

El blanco molecular del hsa-miR-99b-5p es el EIF2C2 o también conocido como AGO2 (figura 13). Para la represión del mRNA blanco, las proteínas AGO interactúan directamente con un miembro de la familia de proteínas GW. Las proteínas GW se caracterizan por un dominio N que contiene múltiples repeticiones de glicina-triptófano (GW). Este dominio interactúa directamente con las proteínas AGO y por lo tanto se denomina el dominio de unión AGO (Meister, 2013).

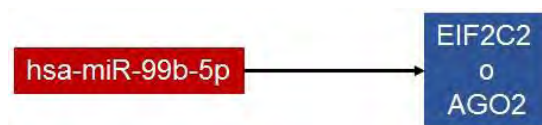


Figura 13 Blanco molecular del miR-99b-5p

El hsa-miR-99b-5p presenta una tendencia de expresión a través del tiempo partiendo de la inhibición a las 12h y 24h para posteriormente expresarse a las 48h y 72h, lo que sugiere que el blanco molecular EIF2C2 sería expresado a tiempos tempranos durante la infección con DENV2. Por otro lado, el EIF2C2 está relacionado con el hsa-miR-30e-5p ya que uno de los blancos moleculares de este miRNA es el TNRC6A el cual es una proteínas GW.

El TNRC6A es una proteína de la familia GW182, los cuales son componentes de los complejos silenciadores inducidos por miRNA (miRISCs) en células animales y desempeñan papeles importantes en el silenciamiento de genes mediados por miRNA. Interaccionan con las proteínas AGO, componentes centrales de miRISC y se localizan principalmente en cuerpos de procesamiento (P), que son focos citoplásmicos que contienen las proteínas implicadas en

diversos procesos post-transcripcionales tales como la degradación del mRNA, el almacenamiento y la represión traduccional (figura 14). Hay tres parálogos de GW182 en vertebrados TNRC6A/GW182, TNRC6B y TNRC6C (Nishi *et al.*, 2013).

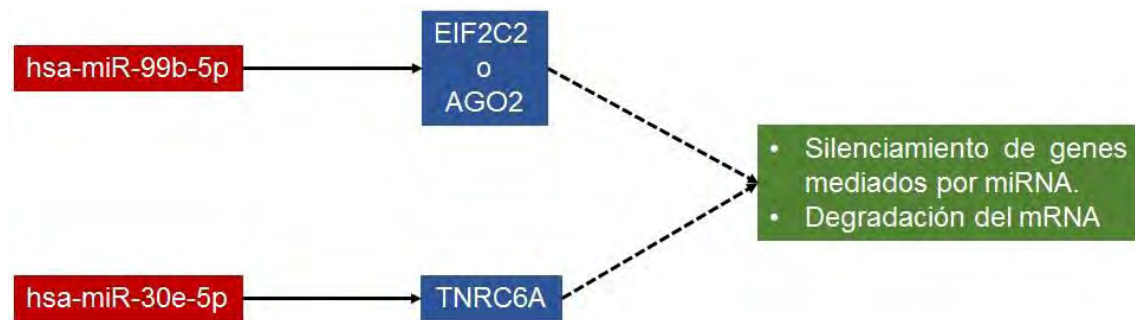


Figura 14 Interacción de los blancos moleculares del miR-99b-5p y el miR-30e-5p

El N terminal de la repetición GW que contiene las regiones de los tres TNRC6 interactúan con las cuatro proteínas Argonautas (AGO1-4). También TNRC6A, TNRC6B y TNRC6C silencian la expresión de mRNAs unidos. Esta actividad es mediada por sus C terminal y, por lo tanto, es independiente de la interacción con AGO1-4. El silenciamiento por TNRC6A, TNRC6B y TNRC6C se efectúa por cambios en la expresión de proteínas y estabilidad del mRNA que puede en parte atribuirse a la deadenilación. TNRC6A, TNRC6B y TNRC6C son reclutados por los blancos de los miRNAs a través de una interacción entre su dominio N terminal y una proteína Argonauta; los TNRC6s luego promueven la represión traduccional y/o la degradación de los blancos de los miRNA a través de un dominio de silenciamiento C terminal (Lazzaretti *et al.*, 2009).

El hsa-miR-30e-5p presenta un perfil de expresión del tipo inhibitorio y tiene como posible blanco molecular al TNRC6 dicho blanco puede interactuar con EIF2C2, el cual es un blanco molecular del hsa-miR-99b-5p, por lo tanto, puede estimular un mecanismo de silenciamiento de genes mediados por miRNAs y también puede ocurrir la degradación del mRNA.

El hsa-miR-30e-5p tiene un posible blanco molecular común con el hsa-miR-16-5p el cual es el CD80. Existe una interacción entre el CD80 y el CD28, por lo que

dentro de los blancos moleculares que se eligieron para el hsa-miR-16-5p se encuentra el CD28.

Se ha demostrado que el bloqueo de la interacción entre CD28 y CD80 con anti-CD80 MAb aumenta la producción de IL-4 en ratones. Por el contrario, el bloqueo de la interacción de CD86 con CD28 *in vitro* se mostró para aumentar la producción de IFN- γ (Kuchroo *et al.*, 1995). Estos datos de los sistemas murinos apoyan un modelo por el que la coestimulación CD80 promueve el desarrollo de células Th1, pero la coestimulación CD86 conduce a la diferenciación hacia células Th2 (Racke *et al.*, 1995; figura 15). La coestimulación de células T humanas CD4⁺ en reposo con CD80 o CD86 dio como resultado una producción equivalente de IL-2 e IFN- γ . Sin embargo, la coestimulación con CD80 resultó en más producción de GM-CSF que con CD86, mientras que la coestimulación con CD86 dio una producción más eficiente de IL-4 y TNF- β que con CD80 (Freeman *et al.*, 1995). Por lo tanto, la coestimulación con CD86 parecía dirigir la respuesta inmune hacia el desarrollo de Th2, pero CD80 proporcionó una señal más parecida a Th1. Estos datos son consistentes con la observación de que el CD80 humano, pero no el CD86 fue capaz de generar células efectoras citolíticas humanas. Además, CD86 fue menos eficaz que CD80 en la regulación de la expresión de CD28 después de la ligadura (Slavik *et al.*, 1999).

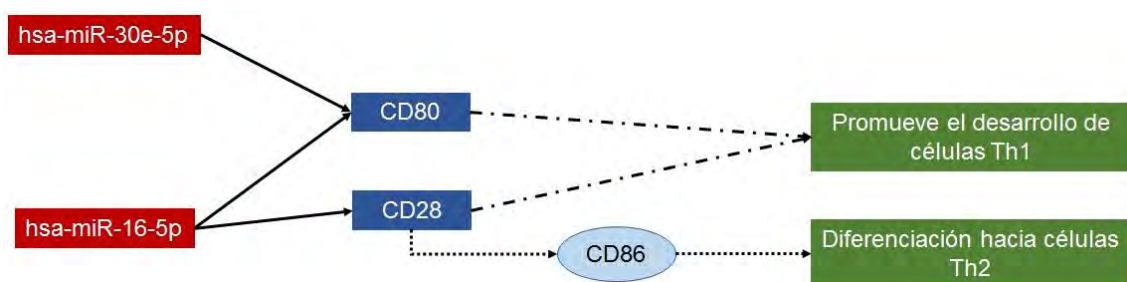


Figura 15 Interacción de los blancos moleculares del miR-30e-5p y miR-16-5p

El hsa-miR-30e-5p tiene como posible blanco la IL-7 y el hsa-miR-16-5p tiene como posible blanco la IL-15 estas dos IL junto con la IL-2, IL-4, IL-9 e IL-21 tienen receptores multiméricos que utilizan la cadena gamma común (γ c). Verbist

y Klonowski en el 2012 sugieren que una respuesta inmune eficaz a un patógeno viral invasor requiere las acciones combinadas de ambas células inmunes innatas y adaptativas. Las células NK y las células T citotóxicas CD8 son capaces de dirigir el acoplamiento de células infectadas y la mediación de respuestas antivirales. Tanto las NK y las células T CD8 dependen de las señales comunes de las citoquinas de la cadena gamma (γ c) para su desarrollo y homeostasis. La γ c de la IL-15 está muy bien caracterizada por su papel en la promoción del desarrollo y la homeostasis de las células NK y CD8, pero la literatura emergente sugiere que la IL-15 media las respuestas antivirales de estas poblaciones celulares durante una respuesta inmune activa (figura 16). Tanto las células NK como las células T CD8 deben activarse, migrar a los sitios de infección, sobrevivir en esos sitios y expandirse en orden para ejercer al máximo sus funciones efectoras, e IL-15 puede modular cada uno de estos procesos.

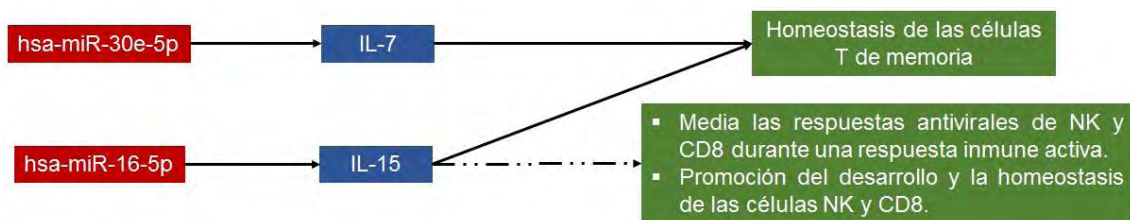


Figura 16 Interacción de los blancos moleculares del miR-15-5p y el miR-30e-5p

En la figura 17 se muestran las interacciones de los blancos moleculares de los tres miRNAs.

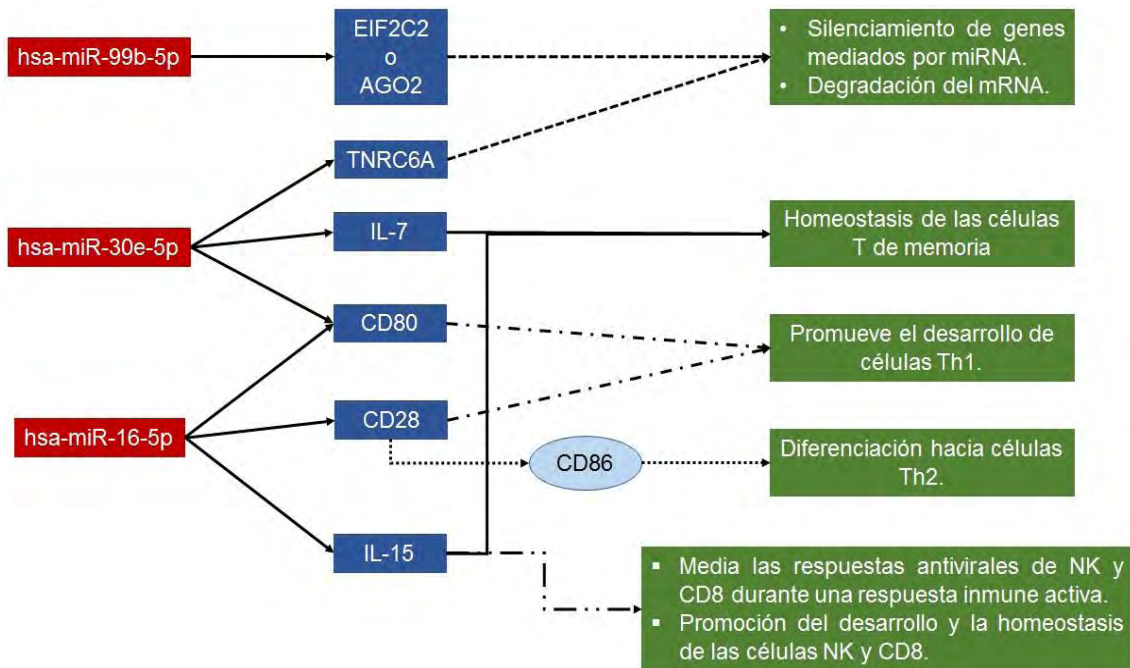


Figura 17 Interacciones de los blancos moleculares de los tres miRNAs

La figura 18 es un esquema ilustrativo del perfil de expresión de los miRNAs durante la infección con DENV-2 tanto en los exosomas como en la célula. El miR-99b-5p y el miR-16-5p en exosomas presentan un perfil de expresión y el miR-30e-5p presenta una tendencia inhibitoria, sin embargo, en la célula el miR-99b-5p y el miR-16-5p tienden a inhibirse y el miR-30e-5p tiende a expresarse. También se muestran cómo se relacionan los posibles blancos moleculares correspondientes a cada miRNA dependiendo el perfil de expresión del miRNA.

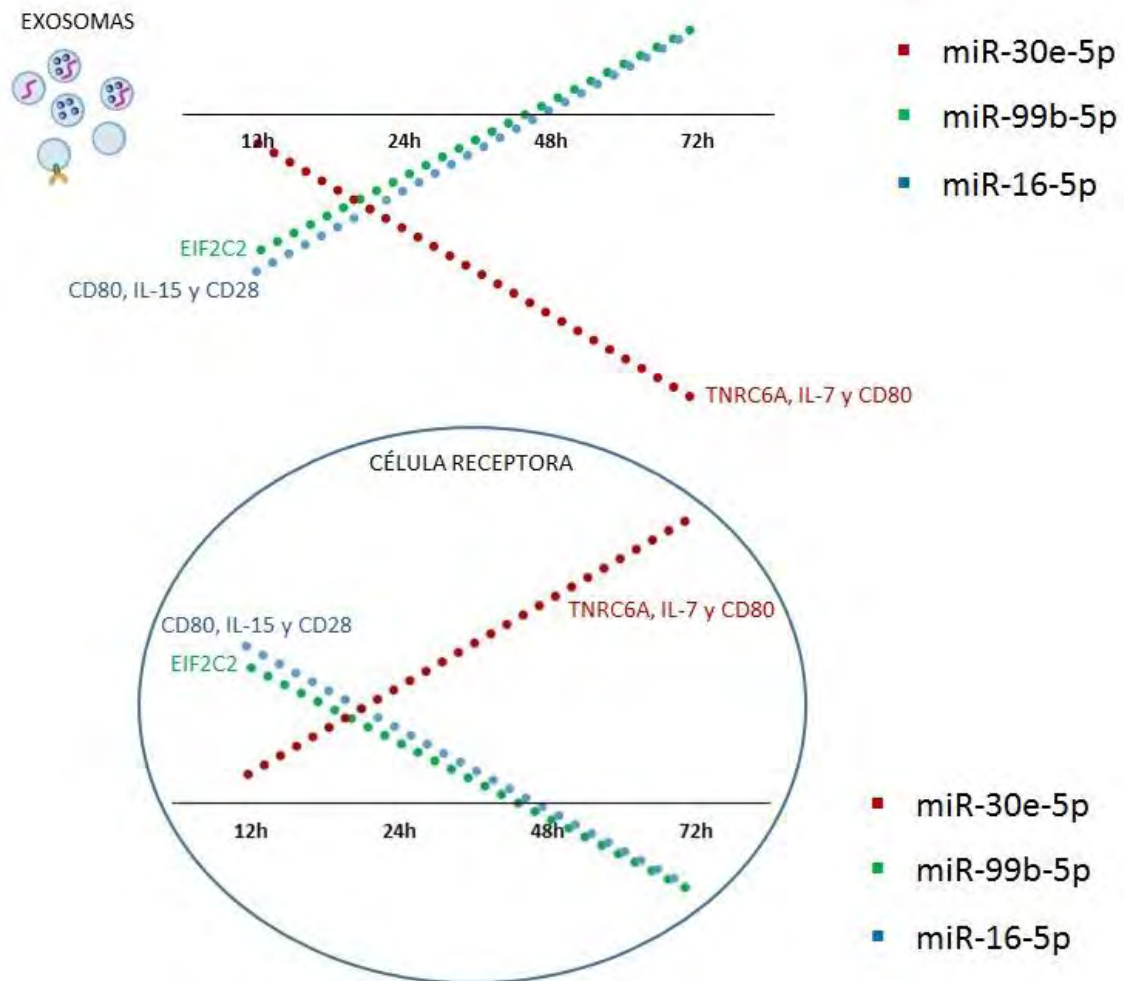


Figura 18 Esquema ilustrativo del perfil de expresión de los miRNAs durante la infección con DENV2 en exosomas y en la célula.

Las posibles interacciones de los tres miRNAs evaluados con sus posibles blancos moleculares puede resultar un tanto incierto ya que dichos blancos moleculares fueron deducidos por computadora y además existe la posibilidad de que dichos blancos sean inhibidos por otros blancos moleculares de distintos miRNAs, por ello es importante conocer y establecer el perfil de expresión de todos los miRNAs presentes en exosomas derivados de células U937 DC-SIGN infectadas con DENV-2 para realmente establecer y conocer cuáles son los blancos moleculares inhibidos y expresados durante la infección con DENV-2.

9. Conclusiones

- Se aislaron exosomas derivados de las células U937 DC-SIGN tanto de infectadas con DENV-2 y no infectadas (Mock).
- Se purifico el RNA de exosomas de las células U937 DC-SIGN infectadas y Mock, dicho RNA sirvió de base para realizar la qRT-PCR y con ello se pudo establecer un perfil de expresión para los tres miRNAs evaluados. Para el hsa-miR-30e tiene una tendencia inhibitoria y aumenta su inhibición conforme al tiempo evaluado, el hsa-miR-99b-5p y el hsa-miR16-5p presentan una tendencia de expresión, pero al principio de la infección con DENV-2 presentan una tendencia de inhibición, esto se puede observar a las 12 y 24 horas pero a partir de las 48 horas se empiezan a expresar.

10. Perspectivas

- Identificar todos los miRNAs contenidos en exosomas de células U937 infectadas con DENV-2, así como su perfil de expresión, realizando un microarreglo.
- Identificar si existe una inhibición de los posibles blancos moleculares cuando interactúan dos o más en exosomas de células U937 infectadas con DENV-2.
- Realizar un estudio del efecto de cada miRNA de exosomas de células U937 infectadas con DENV-2 así como también un estudio donde se evalúen todos los miRNAs para conocer cuáles son los productos finales que se expresan o inhiben durante la infección por DENV-2.

11. Bibliografía

- Acosta E. G., Castilla V. y Damonte E. B. (2008). Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of General Virology*. 89. 474-484.
- Angel RMD y valle JR-d. (2013). Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. *PLoS Pathog* 9(10): e1003551. doi: 10.1371/journal.-ppat.1003551.
- Babst M., Katzmann D. J., Snyder W. B., Wendland B. y Emr S. D. (2002). Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body. *Developmental Cell*. Vol. 3. 283-289.
- Bäck A. T. y Lundkvist Å. (2013). *Infection Ecology and epidemiology*. 3: 19839.
- Baez Navarro Carlos Enrique. (2016). Evaluación de la expresión de miRNAS's presentes en exosomas de células monocíticas infectadas por dengue virus. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. Vol. 116, 281-297.
- Bhatt S., Gething P. W., Brady O. J., Messina J. P. Farlow A. W., Moyes C. L., Drake J. M., Brownstein J. S., Hoen A. G., Sankoh O., Myers M. F., George D. B., Jaenisch T., Wint G. R. W., Simmons C. P., Scott T. W., Farrar J. J. y Hay S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*. Vol. 496. 504-507.
- Cabrera-Hernandez A. y Smith D. R. (2005). Mammalian Dengue Virus Receptors. *Dengue Bulletin*. Vol. 29. 119-135.
- Chahar H. S., Bao X. y Casola A. (2015). Exosomes and Their role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses. *Viruses*. 7, 3204-3225.
- Chiu W-W., Kinney R. M. y Dreher T. W. (2005). Control of translation by the 5'- and 3'- Terminal regions of the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*. Vol. 79, No. 13. 8303-8315.

- De La Guardia C. y Leonart R. (2014). Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *BioMed Research International*. Vol. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/825039>
- Escaleras-Cueto M., Medina-Martínez I., del Angel R. M., Berumen-Campos J., Gutiérrez-Escolano A. L. y Yocupicio-Monroy M. (2015). Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. *Virus Research* 196. 105-112.
- Fabbri M., Paone a., calore f., galli r., Gaudio e., Santhanam R., Lovat F., Fadda P., Mao c., Nuovo G. J., Zanesi N., Crawford M., Ozer G. H., Wernicke D., Alder H., Caligiuri M. A., Nana-sinkam P., Perrotti D. y Croce C. M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: (31): E2110-6.
- Freeman G. J., Boussiotis V. A., Anumanthan A., Bernslein G. M., Ke X-Y., Rennert P. D., Gray G. S., Gribben J. G. y Nadler L. M. (1995). B7-1 and B7-2 Do Not Deliver Identical Costimulatory Signals, Since B7-2 but Not B7-1 Preferentially Costimulates the Initial Production of IL-4. *Immunity*. Vol. 2. 523-532.
- Gagnon S. J., Ennis F. A. y Rothman A. L. (1999). Bystander Target Cell Lysis and Cytokine Production by Dengue Virus-Specific Human CD4+ Cytotoxic T-Lymphocyte Clones. *Journal of Virology*. Vol. 73. No. 5. 3623-3629.
- Geijtenbeek T. B. H. y Van Kooyk Y. (2003). Pathogens target DC-SIGN to influence their fate: DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. Vol. 111. 698-714.
- Germi R., Crance J-M., Garin D., Guimet J., Lortat-Jacob H., Ruigrok R. W. H., Zarski J-P. y Drouet E. (2002). Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus. *Virology* 292, 162-168.
- Goldie B. J., Dun M. D., Lin M., Smith N. D., Verrills N. M., Dayas C. V. y Cairns M. J. (2014). Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-

- enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic Acids Research*. Vo. 42, No. 14. 9195-9208.
- Holden K. L. y Harris E. (2004). Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology* 329, 119-133.
 - Huang X., Yuan T., Tschannen M., sun Z., Jacob H., Du M., Liang M., Dittmar R. L., Liu Y., Liang M., Kohli M., Thibodeau S. N., Boardman L. y Wang L. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BioMed Central Genomics*. 14:319.
 - Johnstone R.M., Adam M., Hammond J. R., Orr L. y Turbide C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 262, 9412-9420.
 - Keller S., Sanderson M. P., Stoeck A. y Altevogt P. (2006). Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters*. 107, 102-108.
 - Klasse P. J., Bron R. y Marsh M. (1998). Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 34. 65-9.
 - Kliks S.C., Nimmanitya S., Nisalak A. y 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.
 - Kraus A. A., Messer W., Haymore L. B. y de Silva A. M. (2007). Comparison of Plaque- and Flow Cytometry-Based Methods for Measuring Dengue Virus Neutralization. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 45. No. 11. 3777-3780.
 - Kuadkitkan A., Wikan N., Fongsaran C. y smith D. R. (2010). Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*. 406. 149-161.
 - Kuchroo V., Das M. P., Brown J. A., Ranger A. M., Zamvil S. S., Sobel R. A., Weiner H. L., Nabavi N. y Glimcher L. H. (1995). B7-1 and B7-2 Coestimulatory Molecules Activate Differentially the Th1/Th2

Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy. *Cell*. Vol. 80. 707-718.

- Lazzaretti D., Tournier I. y Izaurralde E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA*. Vol. 15. No. 6. 1059-1066.
- Lindenbach B. D. y Rice C. M. (2003). *Molecular Biology of Flaviviruses*. *Advances in Virus Research*. Vol 59. 23-61.
- Lindenbach B. D., Thiel H-J. y Rice C. M. (2007). *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. En Knipe D. M. and Howley P. M. *Fields Virology*, 5th edition. Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1101-1152.
- Lühn K., Simmons C. P., Moran E., Dung N. T. P., Chau T. N. B., Quyen N. T. H., Thao L. T. T., Ngoc T. V., Dung N. M., Wills B., Farrar J., McMichael A. J., Dong T. y Rowland-Jones S. (2007). Increased frequencies of CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in acute dengue infection. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 204. No. 5. 979-985
- McBurney S. P., Sunshine J. E., Gabriel S., Huynh J., Sutton W. F., Fuller D. H., Haigwood N. L. y Messer W. B. (2016). Evaluation of protection induced by a dengue virus serotype 2 envelope domain III protein scaffold/DNA vaccine in non-human primates. *Vaccine*. 34. 3500-3507.
- Meckes Jr. D. G. y Raab-Traub N. (2011). Microvesicles and viral infection. *Journal of Virology*. 85, 12844-12854.
- Meister G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, doi: 10.1038/nrg3462.
- Mondotte J. A., Lozach P.-Y., Amara A. y Gamarnik A. V. (2007). Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. *Journal of Virology*. Vol. 81. No. 13. 7136-7148.
- Mosso C., Galván-Mendoza I. J., Ludert J. E. y del Angel R. M. (2008). Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology*. 378. 193-199.
- Nishi K., Nishi A., Nagasawa T. Ui-Tei K. (2013). Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA*. Vol. 19. No. 1. 17-35.

- Noppakunmongkolchai W., Poyomtip T., Jittawuttiyapoka T., Luplertlop N., sakuntabhai a., Chimnaronk S., Jirawatnotai S. y Tohtong R. (2016). Inhibition of protein kinase C promotes dengue virus replication. *Virology Journal*. 13: 35.
- Pegtel D. M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D. A., von Eijndhoven M. A. J., Hopmans E. S., Lindenberg J. L., de Gruijl T. D., Würdinger T. y Middeldorp J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 107. No. 14. 6328-6333.
- Perera R. y Kuhn R. J. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current Opinion in Microbiology*. 11(4): 369-377.
- Perez-hernandez D., Gutiérrez-Vázquez C., Jorge I., López-Martín S., Ursa A., Sánchez-Madrid F., Vázquez J. y Yáñez-Mó M. (2013). The Intracellular interactome of Tetraspanin-enriched Microdomains Reveals Their Function as sorting Machineries toward exosomes. *The journal of Biological chemistry*. Vol. 288. No. 17. 11649-11649.
- Racke M. K., Scott D. E., Quigley L., Gray G. S., Abe R., June C. H. y Perrin P. J. (1995). Distinct Roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the Initiation of Experimental Allergic Encephalomyelitis. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 96. 2195-2203.
- Rastogi M., Sharma N. y Singh S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*. 13: 131.
- Reyes-del Valle J. y del Angel R. M. (2004). Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant e protein ligand. *Journal of Virological Methods*. Vol. 116. 95-102.
- Ruiz Jiménez Fernando. (2015). Aislamiento y caracterización de exosomas producidos por células U937-DC-SIGN infectadas por DENV. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Ciudad de México.
- Sato-Kuwabara Y., Melo S. A., Soares F. A. y Calin G. A. (2015). The fusion of two worlds: Non-coding RNAs and extracellular vesicles –

- diagnostic and therapeutic implications (Review). *International Journal of Oncology*. 46: 17-27.
- Schorey J. S., Cheng Y., Singh P. P. y Smith V. L. (2014). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports*. Vol. 16. No. 1. 24-43.
 - Shah M., Wadood A., Rahman Z. y Husnain T. (2013). Interaction and Inhibition of Dengue Envelope Glycoprotein with Mammalian Receptor DC-Sign, an In-Silico Approach. *PLoS ONE*. Vol. 8. No. 3. doi:10.1371/journal.pone.0059211
 - Slavik J. M., Hutchcroft J. E. y Bierer B. E. (1999). CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 Families Signaling and Funtion. *Immunologic Research*; 19/1: 1-24.
 - Stephenson J. R. (2005). Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin of the World Health Organization*. 83(4):308-314.
 - Stuffers S., Wegner C. S., stenmark H. y Brech A. (2009). Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic*. 10. 925-937.
 - Tassaneetrithep B., Burgess T. H., Granelli-Piperno A., Trumpfheller C., Finke J., Sun W., Eller M. A., Steinman R. M., Schlesinger S. y Marovich M. A. (2003). DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 197. No. 7. 823-829.
 - Taylor D. D. y Gercel-Taylor C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 110. 13-21.
 - Thepparit C. y 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 Dengue Virus Serotype 1 Receptor. *Journal of Virology*. Vol. 78. No. 22. 12647-12656.
 - Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J. y Lötvall J. O. (2007). *Nature Cell Biology*. Vol. 9. No. 6. 654-659.
 - van der Schaar H.M., Wilschut J. C. y Smit J. M. (2009). Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology* 214. 613-629.

- van Niel G., Charrin S., Simoes S., Romao M., Rochin L., Saftig P., Marks M. S., Rubinstein E. y Raposo G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental Cell*. 21 (4): 708-721.
- Velandia M. L. y Castellanos J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. Volume 15, Issue 1. 33-43.
- Verbist K. C. y Klonowski K. D. (2012). Functions of IL-15 in Anti-Viral Immunity: Multiplicity and Variety. *Cytokine*, 59 (3): 467-478.
- Whitehorn J. y Simmons C. P. (2011). The pathogenesis of dengue. *Vaccine* 29, 7221-7228.
- World Health Organization. (2016). Dengue y dengue grave. Visitado el 16 de octubre del 2016 En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
- Wu S., He L., Li Y., Wang T., Feng L., -jiang L., Zhang P. y Huang X. (2013). miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6. *Journal of Infection*. Vol. 67. 4. 329-341.
- Yam-Puc J. c., Cedillo-Barrón L., Aguilar-Medina E. M., Ramos-Payán R., Escobar-Gutiérrez A. y Flores-Romo L. (2016). The Cellular Bases of Antibody Responses during Dengue Virus Infection. *Frontiers in immunology*. Vol. 7. Artículo 218. doi: 10.3389/fimmu.2016.00218.
- Zhang J., Li S., Li L., Li M., Guo C., Yao J. y Mi S. (2015). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13. 17-24.
- Zhu X., He z., Hu Y., Wen W., Lin C., Yu J., Pan J., Li R., Deng H., Liao s., Yuan J., Wu J., Li J. y Li M. (2014). MicroRNA-30e* Suppresses Dengue Virus Replication by Promoting NF-κB-Dependent IFN Production. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(8): e3088. Doi:10.1371/journal.pntd.0003088.