



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNA's  
PRESENTES EN EXOSOMAS DE CÉLULAS  
MONOCÍTICAS INFECTADAS POR DENGUE VIRUS**

TESIS

QUE PRESENTA  
CARLOS ENRIQUE BAEZ NAVARRO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DIRECTORA  
DRA. SOFÍA LIZETH ALCARAZ ESTRADA

ASESORA  
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE



CIUDAD DE MÉXICO

7 de diciembre de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*"El final de una historia es solamente el comienzo de otra"*

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE, bajo la dirección de la Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada, a quien le agradezco haber abierto sus puertas para mí, su guía y confianza depositada para el desarrollo de este proyecto, porque en ella busqué a alguien con quien poder aprender más del mundo de la Virología y en el camino terminé encontrando también a una gran persona que siempre me brindó palabras de ánimo, me abrazó cuando más quería caer, siempre me escuchó y brindó una sonrisa sin juzgarme, me apoyó y pude llegar a confiar en ella mas allá de las puertas de un laboratorio, y es que de ella aprendí que antes que científicos, somos humanos y como tal hay cosas que no podemos dejar atrás sin más, gracias por todo su tiempo y por estar allí para todos los que somos como sus hijos de la ciencia.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde, por su asesoría y apoyo no solo en la revisión de la presente tesis, sino también por toda la ayuda y enseñanzas durante el tiempo que tuve el honor de ser su alumno; porque desde que la conozco nunca me ha faltado su confianza, apoyo y consejos.

Al IBT Eduardo Moreno Rodríguez, por todos sus consejos, enseñanzas y por su aportación en la revisión estructural de más de un apartado de la presente tesis.

A la QFB Ruth Arteaga Zamperio, por toda su paciencia, cariño y apoyo durante todos estos años de conocernos; por su ayuda y sugerencias en el desarrollo de este trabajo.

Al M en C. Fernando Ruíz Jiménez, porque su apoyo fue crucial en el desarrollo experimental de la presente tesis, sin contar todos sus consejos, regañones y ánimo que nunca hicieron falta.

A la Dra. Martha Yocupicio Monroy y a la UACM, por su ayuda, consejos y permitirnos el uso de equipo o material cuando fue necesario y por compartir con nosotros su experiencia e ingenio para realizar RT-PCR de miRNA's.

Al Dr. Juan Santiago Salas Benito, por su donación de la cepas DEN2, sin las cuales no habría podido culminar este proyecto satisfactoriamente.

A la Dra. Rosa María del Ángel por permitirme trabajar en su laboratorio el tiempo que fue necesario durante este proyecto y porque tanto ella con su equipo de trabajo siempre estuvieron dispuestos a ayudar, sobre todo, gracias por todas las células U937 DC-SIGN donadas para los experimentos.

Al IBQ Arturo Rodríguez Jacob, por todo su apoyo durante mis estudios de licenciatura, consejos y guía, por su amplia participación en mi formación profesional en más de un aspecto.

A la Universidad de Chile, por todas las enseñanzas en el área de Biología Molecular, Microbiología y Fisiopatología; porque gracias a ello pude reafirmar mi vocación y encontrar el valor para incursionarme en campo de la Virología, llevándome al desarrollo del presente proyecto.

Y principalmente quiero agradecer a la FES-Z y a todo el profesorado involucrado en mi educación durante los estudios de licenciatura, sin cuyos conocimientos y experiencias aportados; consejos y guía, no habría podido si quiera entender el título de

un trabajo como este, mucho menos realizarlo; así mismo a la UNAM por haberse vuelto mi una segunda casa y aportar todos los recursos para mi preparación profesional.

## DEDICATORIA

Para aquélla mujer que tanto me ha dado, cuya entrega y compromiso hacia mí jamás tendrán igual, de quien he aprendido a nunca rendirme y siempre perseverar, por todo su cariño y esfuerzo, porque esta tesis, mi vida y mi carrera, son mas tuyas que mías, a mi madre, Martha Lizmeth Baez Navarro.

A aquél gran ser humano que ha aguantado tanto de mí y que sin necesidad también ha dado tanto de sí por mí y mi madre, por su constancia y esfuerzo, por nunca rendirse, por sus lecciones de humildad, coraje y responsabilidad, a aquél que con gusto puedo llamar mi padre sin necesidad de llevar su sangre, porque hay títulos que se ganan con el corazón y el compromiso, a Pablo Alejandro Estrada Medina.

Para la gran mujer que desde pequeño siempre estuvo a mi lado, que me acompañó a lo largo de 17 años de mi vida, por todo su cariño constancia, por heredarme más que sus genes, su carácter y coraje, su pasión y entrega, porque mucho de lo que hago en mi vida lo hago con su memoria en mi corazón y desearía poder compartir este trabajo con ella, porque sé que estaría orgullosa de ver en lo que me he convertido y por ser gran parte de mi inspiración, porque nunca me faltó un abrazo suyo, un mensaje de felicitación o buenos días, porque en vida me dio todo de sí, por una y mil cosas más, a mi abuela en la vida y en la muerte, María del Carmen Martha Navarro Domínguez.

A ellos, sin los cuáles no sería absolutamente nada, porque son mi inspiración y de las más grandes razones que tengo para querer ser mejor cada día.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	15
I. MARCO TEÓRICO	18
1.1. Dengue	18
1.2. Epidemiología	18
1.3. Virus del Dengue	20
1.3.1. Proteínas virales	22
1.3.2. Ciclo de replicación	27
1.3.3. Patogenicidad y virulencia	31
1.4. Exosomas	34
1.4.1. Función de los exosomas	36
1.4.2. Marcadores moleculares de exosomas	36
1.4.3. Exosomas y RNA virus	37
1.5. micro RNA	38
1.5.1. Síntesis de miRNA's	39
1.5.2. Mecanismo de acción de los miRNA's	40
1.6. miRNA's y exosomas	41
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
III. HIPÓTESIS	47
IV. OBJETIVOS	48
4.1. Objetivo general	48
4.2. Objetivos específicos	48
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	49
5.1. Tipo de estudio:	49

5.2. Población de estudio	49
5.3. Variables	49
5.3.1. Independientes	49
5.3.2. Dependientes	49
5.4. Modelo de análisis estadístico	50
5.5. Diseño general del estudio	51
VI. MATERIAL Y MÉTODO	52
6.1. Cultivo celular	52
6.2. Aislamiento de exosomas	52
6.3. Extracción y cuantificación de RNA	54
6.4. Análisis de miRNA's y blancos moleculares	55
6.5. qRT-PCR	56
6.5.1. Retrotranscripción	56
6.5.2. PCR en tiempo real	57
6.6. Análisis de expresión diferencial	58
VII. RESULTADOS	60
7.1. Análisis y selección de miRNA's a evaluar	60
7.1.1. miR-146a-5p	63
7.1.2. Let-7e-5p	63
7.1.3. miR-29c-3p	64
7.2. qRT-PCR	64
7.3. Expresión diferencial de miRNA's	65
7.4. Análisis estadístico de datos	68
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
8.1. Diferencia de expresión en los miRNA's	72
8.2. Relación del cambio de expresión de los miRNA's con el tiempo	73
8.3. Análisis de posibles mRNA blancos de los miRNA's y sus implicaciones	74
IX. CONCLUSIONES	84
X. PERSPECTIVAS	85
XI. REFERENCIAS	86
XII. ANEXOS	99

12.1.	Preparación de reactivos _____	99
12.2.	Datos completos de resultados _____	100
12.2.1.	Perfil de expresión de miRNA's _____	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma y estructura de las proteínas del virus DEN _____	21
Figura 2. Virus del dengue _____	23
Figura 3. Estructura de la proteína E _____	29
Figura 4. Esquema de los cambios estructurales de las proteínas E y prM/M _____	30
Figura 5. Ciclo replicativo del DEN _____	30
Figura 6. Estructura y composición de un exosoma _____	35
Figura 7. Esquema gráfico de la función dE _____	59
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 3% _____	65
Figura 9. Diferencia de expresión de miRNA's _____	66
Figura 10. Gráficos comparativo de Ct _____	67
Figura 11. Porcentaje de diferencia de expresión _____	68
Figura 12. Interacciones de miRNA's y su afección en productos proteicos finales _____	82

## ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1. MiRNA's constitutivos de exosomas _____	42
Cuadro 2. Perfil de expresión de algunos miRNA's en casos relacionados con DEN _____	43
Cuadro 3. miRNA's seleccionados, alteraciones reportadas y mRNA blancos a analizar _____	61
Cuadro 4. Estructura principal de horquilla y secuencia de miRNA maduro de miRNA's seleccionados _	61
Cuadro 5. Secuencias de interacción en regiones UTR de mRNA posibles de unión para miRNA's seleccionados _____	62
Tabla 1. Condiciones de RT-PCR _____	56
Tabla 2. Condiciones de PCR en tiempo real _____	57
Tabla 3. Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de Ct _____	69
Tabla 4. Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de dE _____	70
Tabla 5. Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de Ct _____	70
Tabla 6. Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de Ct por tiempo _____	71

## ABREVIATURAS

<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>Ago</b>	<i>Argonaute RISC Catalytic Component</i> (Componente catalítico argonauta de RISC)
<b>BCORL1</b>	<i>B-Cell Lymphoma 6 Protein Corepressor-like 1</i> (Correpressor tipo 1 de la Proteína 6 de Linfoma de Células B)
<b>CCL3</b>	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 3</i> (Ligando 3 de quimiocinas con motivo C-C)
<b>CL</b>	Célula de Langerhans
<b>DC-SIGN</b>	<i>Dendritic Cell Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> (Molécula de adhesión interna específica de células dendríticas con sin anclaje a integrina)
<b>DGCR8</b>	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region in Gene 8</i> (Región Crítica del Síndrome de DiGeorge en el gen 8)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxiribonucleíco)
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i> (ADN complementario)
<b>DEN</b>	Virus del Dengue
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Medio Eagle Modificado de Dulbecco)
<b>EF</b>	<i>Elongation Factor</i> (Factor de elongación)
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
<b>EO</b>	Estrés Oxidativo

<b>ESCRT</b>	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i> (Complejos especiales requeridos para el transporte de endosomas)
<b>Fc-R</b>	Receptor de la Fracción constante de anticuerpos
<b>FHD</b>	Fiebre Hemorrágica por Dengue o Dengue Grave
<b>GMCSF</b>	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas y Macrófagos)
<b>HCV</b>	<i>Hepatitis C Virus</i> (Virus de Hepatitis C)
<b>HDAC4</b>	<i>Histone Deacetylase 4</i> (Histona Desacetilasa 4)
<b>HDL</b>	High-Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Virus de Inmunodeficiencia Humana)
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitario Humano)
<b>HSP</b>	<i>Heat Shock Protein</i> (Proteína de Choque Térmico)
<b>HTLV</b>	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i> (Virus Linfotrópico de Células T Humanas)
<b>ICAM</b>	<i>Intracellular Molecular Adhesion</i> (Adhesión molecular intracelular)
<b>IF</b>	<i>Initiation Factor</i> (Factor de iniciación)
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF</b>	Interferón
<b>iRNA</b>	<i>Interference RNA</i> (RNA de interferencia)
<b>LAMR1</b>	<i>Laminin Receptor 1</i> (Receptor para laminina tipo 1)
<b>MAC</b>	<i>Membrane Attack Complex</i> (Complejo de Ataque a la Membrana)
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo mayor de histocompatibilidad)
<b>miRNA</b>	micro RNA
<b>MOI</b>	<i>Multiplicity of Infection</i> (Multiplicidad de Infección)

<b>MVB</b>	<i>Multivesicular Bodies</i> (Cuerpos multivesiculares)
<b>NFIA</b>	<i>Nuclear Factor I A</i> (Factor Nuclear I A)
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
<b>NS</b>	<i>Non Structural protein</i> (Proteína no estructural)
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Buffer Salino de Fosfatos)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>PFU</b>	<i>Plaque Forming Unit</i> (Unidad Formadora de Placas)
<b>PMA</b>	<i>Phorbol 12-myristate-13-acetate</i> (12-miristato-13-acetato de forbol)
<b>pre-miRNA</b>	<i>Precursor micro RNA</i> (micro RNA precursor)
<b>pri-miRNA</b>	<i>Primary micro RNA</i> (micro RNA primario)
<b>qRT-PCR</b>	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i> (Retrotranscripción Cuantitativa en Tiempo Real de PCR)
<b>RCF</b>	<i>Relative Centrifugal Force</i> (Fuerza Centrífuga Relativa)
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>RER</b>	Retículo Endoplásmico Rugoso
<b>RISC</b>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i> (complejo de silenciamiento Inducido por RNA)
<b>RLC</b>	<i>RISC-loading Complex</i> (Complejo cargador de RISC)

<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies Reactivas de Oxígeno)
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (Medio del Instituto Memorial Roswell Park)
<b>RpRps</b>	<i>RNA dependent RNA polimerase</i> (ARN polimerasa dependiente de ARN)
<b>siRNA</b>	<i>Small Interference RNA</i> (ARN pequeño de interferencia)
<b>SRSF6</b>	<i>Serine and Arginine Rich Splicing Factor 6</i> (Factor de Splicing 6 rico en Serina y Arginina)
<b>ssRNA</b>	<i>Single-Stranded Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico de una sola hebra)
<b>STAT</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription protein</i> (Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción)
<b>TAT</b>	<i>Trans-Activator of Transcription protein</i> (Proteína Trans-activadora de la transcripción)
<b>TLR</b>	<i>Toll-like Receptor</i> (Receptor de tipo Toll)
<b>TGF</b>	<i>Transformant Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Transformante)
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Factor de Necrosis Tumoral)
<b>TRBP</b>	<i>Trans-activation Response RNA-binding Protein</i> (Proteína enlazadora de RNA en respuesta a trans activación)
<b>UTR</b>	<i>Untranslated Region</i> (Región no traducida)
<b>VCAM</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> (Molécula de Adhesión a Células Vasculares)
<b>vRNA</b>	<i>Viral RNA</i> (ARN viral)
<b>vmiRNA</b>	<i>Viral micro RNA</i> (micro ARN viral)

## INTRODUCCIÓN

El virus del dengue (DEN) es el agente causal de la enfermedad transmitida por artrópodos más importante en el mundo, conocida como fiebre por dengue o simplemente dengue. Aunque se considera que su prevalencia es en zonas tropicales y subtropicales del mundo<sup>1</sup> (países como México, la mayor parte de Suramérica y países de Asia como Nepal, Macao, Hong Kong y algunas zonas de África como Sudán<sup>2</sup>), la OMS indica que al menos la mitad de la población mundial corre el riesgo de padecer la infección por este virus debido al tropismo de sus vectores<sup>3,4</sup>. El mayor riesgo de esta enfermedad son las complicaciones clínicas que se pueden presentar, desembocando en la muerte de alrededor del 2.5% de los pacientes contagiados, principalmente niños, por dengue grave o hemorrágico, o síndrome de choque por dengue.<sup>3</sup>

En la actualidad no se ha logrado desarrollar una cura contra la infección por dengue y la mayoría de vacunas se encuentran aún en desarrollo e investigación clínica<sup>3</sup>, aunque este año fue aprobada en México la primera vacuna tetravalente para este agente infeccioso con una eficacia aún en debate<sup>5,6</sup>.

Comprender la patogenia viral y el funcionamiento del propio virus del dengue durante el proceso infeccioso es crucial para el desarrollo de nuevos métodos paliativos y así mismo poder aplicarlo para el desarrollo de tratamientos que podrían emplearse en otras enfermedades virales; en este ámbito, han comenzado a surgir nuevas áreas de estudio como son los exosomas y los miRNA's que estos transportan.

Los exosomas son microvesículas que funcionan como caballos de Troya o mensajeros de biomoléculas capaces de ayudar a combatir las infecciones virales o propagarlas (según el caso), como mRNA, miRNA, proteínas, etc.<sup>7,8</sup>

Se han reportado alteraciones en la expresión de los miRNA's presentes en las células infectadas con dengue y su presencia se ve aumentada o disminuida en sueros de pacientes según la gravedad o sintomatología que puedan presentar<sup>9</sup>, lo que ha llevado a pensar que estos juegan un papel importante en los procesos infecciosos. El presente estudio se enfocó en el análisis de la variación de expresión de miRNA's contenidos en exosomas, tomando en cuenta la importancia de estos RNA de interferencia que son capaces de reducir la expresión genética<sup>10</sup>, principalmente de moléculas importantes en la respuesta inmune y la capacidad de los exosomas de llevarlos a otras células infectadas o no<sup>11</sup>. Esto con la finalidad de comprender a mayor profundidad la patogenia viral del dengue y conocer más de las implicaciones que estas moléculas podrían tener en el desarrollo de complicaciones clínicas como la aparición de dengue hemorrágico o síndrome de choque por dengue.

Se analizaron tres miRNA's, dos pertenecientes a familias que se han relacionado con la infección por dengue pero cuya presencia en exosomas durante el proceso de infección aún no se ha estudiado del todo (miR-146a-5p y Let-7e)<sup>9,12</sup> y uno (miR-29c-3p) solo identificado como siempre presente en exosomas<sup>13</sup>. Mediante qRT-PCR y con base en las relaciones de Ct que se presentaron durante las amplificaciones se analizó la diferencia de expresión de cada miRNA presente en exosomas de células DC-SIGN sanas e infectadas con DEN serotipo 2 (DEN2), a diferentes tiempos de infección. Encontrándose una expresión diferencial en todos ellos, partiendo de su inhibición hacia

el aumento de su expresión, sin llegar a igualar la expresión de células no infectadas, probablemente por la cantidad de virus empleado, sin embargo, esto da una idea del proceso puede estar siguiendo la célula con la infección, debido a que la mayoría de estos miRNA's puede estar involucrado en la interferencia de la expresión de moléculas relacionadas con la respuesta inmune como INF, IL-6, IL-8 e IL-12, por lo que la célula puede reducir su expresión al inicio de la infección para producir estas citocinas en respuesta a la presencia del virus, pero éste a su vez podría estar induciendo su expresión nuevamente como herramienta de ayuda a su propagación.

Por la importancia que puede implicar la expresión diferencial de los miRNA's durante el proceso infeccioso con DEN, este estudio sirve como base para el planteamiento de nuevos análisis que permitan definir un perfil de expresión de miRNA's presentes en exosomas, a través de microarreglos o secuenciación de última generación, para comprender más a fondo como se puede afectar el tropismo viral y el proceso infeccioso en cuanto a la persistencia viral, así como analizar el efecto de los propios miRNA's liberados en exosomas por células infectadas con DEN, sobre células sanas considerando que al final la interacción de estos miRNA's exosomales que puedan estar llegando a una nueva célula, no es un evento aislado, sino una suma de factores celulares, genéticos, inmunológicos y a su vez de interacción simultánea de todos los miRNA's presentes en un exosoma, sobre diferentes blancos moleculares.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa emergente de gran importancia en salud pública a nivel mundial, cuyo agente etiológico es el virus del dengue (DEN). La infección con este virus puede cursar con manifestaciones clínicas que varían en severidad desde un síndrome febril autolimitado conocido como fiebre del dengue a una fiebre hemorrágica o dengue hemorrágico (conocido actualmente como dengue grave), cuya complicación más severa es el síndrome de choque por dengue.

Las infecciones con dengue pueden ser asintomáticas o presentarse con síntomas gripales como fiebre (alrededor de 40 °C), cefalea intensa, dolor retroocular, mialgia, artralgia, náuseas, vómito, linfadenopatía o salpullido. En el caso del dengue grave debido a la respuesta inmune se presenta un incremento en la permeabilidad vascular y diátesis hemorrágica (con hemorragias pleurales y gastrointestinales), lo que potencialmente puede producir choque hipovolémico, causando hemoconcentración, trombocitopenia y colapso circulatorio. Aunque la enfermedad rara vez persiste por más de 7 días, algunos pacientes presentan una larga convalecencia durante la cual pueden presentarse síntomas neurológicos residuales como fatiga y lasitud, que pueden durar meses.<sup>1, 2, 3</sup>

### 1.2. Epidemiología

En el ámbito mundial, el dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante, ya que produce la fiebre hemorrágica de mayor incidencia. El virus del dengue es un virus del grupo de los arbovirus (Arthropod-Borne Viruses)<sup>14</sup>, transmitido al

ser humano por los mosquitos hembra *Aedes aegypti* y *A. albopictus*, distribuidos actualmente en todos los países tropicales y subtropicales del mundo, principalmente.<sup>1,15,16</sup>

De acuerdo con la OMS, alrededor de la mitad de la población del mundo corre el riesgo de contraer esta enfermedad, sobre todo las personas que habitan en zonas urbanas y semiurbanas de países en vías de desarrollo o con urbanización rápida no planificada. Según estimaciones, se producen alrededor de 390 millones de infecciones por dengue cada año de los cuales 96 millones cursan con manifestaciones clínicas y alrededor de 500 000 personas infectadas padecen dengue grave. Cada año fallecen alrededor del 2.5% de los pacientes (mayoritariamente niños) que padecen dengue grave.<sup>3</sup>

La transmisión, amplificación y reinfección del DEN comienza cuando el mosquito se alimenta con la sangre de un individuo virémico, lo que provoca la infección de las células epiteliales del intestino del mosquito; las partículas virales producidas en estas células son liberadas al hemocele y hacia algunos órganos del mosquito, como las glándulas salivales, que se convierten en órganos reservorios para el virus. La infección en el humano se presenta cuando este mosquito infectado pica nuevamente para alimentarse, liberando saliva y virus durante el proceso. La dosis infectiva media para el humano es baja, debido a que solo 10 PFU son suficientes para causar fiebre por dengue en el 50% de las personas.<sup>15,16</sup>

Desde la identificación del agente causal de dengue en los 70's, su creciente distribución en el mundo ha permitido la diseminación de los diferentes serotipos de dengue en diversos países (principalmente en el sudeste de Asia, América central y

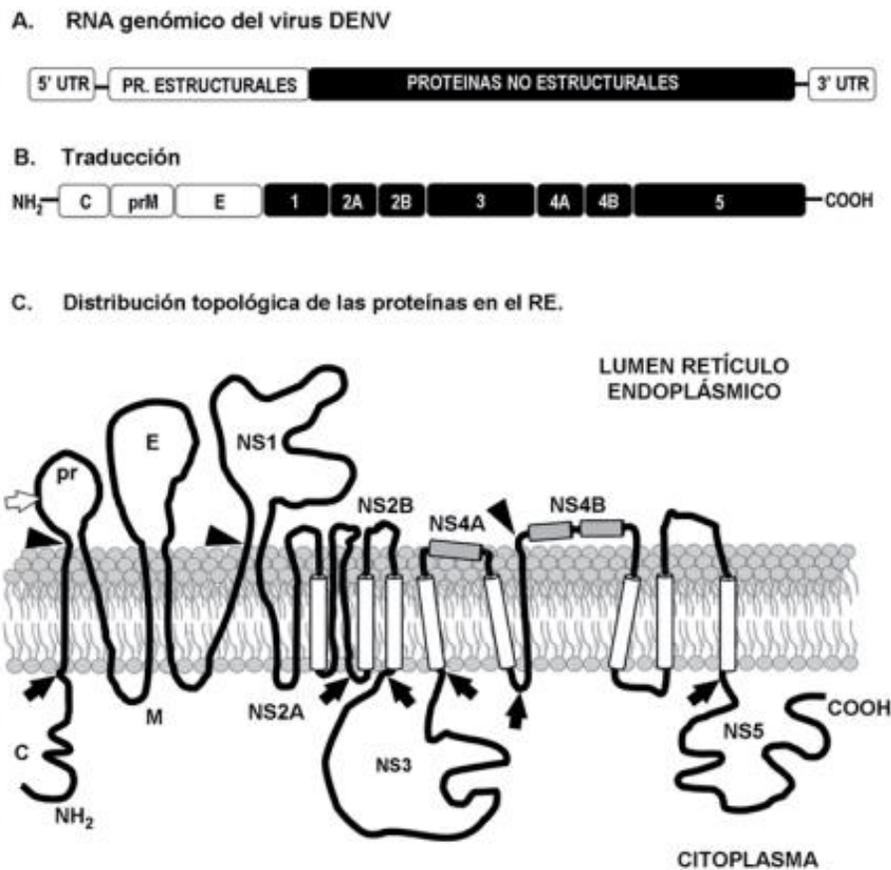
África). El principal vector (*A. aegypti*) vive en hábitats urbanos y se reproduce en recipientes artificiales, se alimenta durante el día (lo que hace difícil evitar las picaduras) y en cada periodo de alimentación una sola hembra pica a más de una persona. Por otro lado, el comercio internacional de neumáticos usados, bambú, etc. (criaderos del vector secundario *A. albopictus*) han permitido la entrada del virus a países como Estados Unidos, Canadá y regiones europeas, principalmente debido a que este mosquito en particular tiene una gran capacidad de adaptación y supervivencia a temperaturas bajo cero<sup>3</sup>; adicionalmente los mosquitos hembra infectados son capaces de transmitir el virus de manera vertical a sus huevos, los cuales son reservorios del virus capaces de soportar la desecación y condiciones adversas por meses, por lo que no se requiere la presencia de huéspedes vertebrados para mantener el virus en la naturaleza.<sup>16,17</sup>

Debido a la falta de tratamientos antivirales adecuados, la principal estrategia actual de combate contra el dengue es el control de la diseminación del vector y control sanitario en zonas de riesgo.<sup>15</sup> Sin embargo, se ha encontrado que el virus también es transmisible horizontalmente por contacto con tejidos y fluidos de pacientes infectados como sangre, hígado, pulmón y riñón; también, los remanentes de desechos, huevecillos y restos de mosquitos son fuentes infecciosas.<sup>16</sup>

### 1.3. Virus del Dengue

El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus*, *Viridae* (familia) *Flaviviridae*; es un virus envuelto de aproximado de 50 nm, con estructura icosaédrica (cápside de aproximadamente 30 nm), posee un genoma constituido por ssRNA+ de aproximadamente 10.7 Kb, con una estructura cap en el extremo 5' y un único marco de lectura abierto, flanqueado por dos regiones no traducidas (UTR) de aproximadamente

100 b hacia el extremo 5' y 350 b hacia el extremo 3'; a diferencia de los mRNA eucariontes, el genoma viral del DEN carece de cola poliA en el extremo 3', en su lugar, tiene una estructura de tallo y burbuja estable y conservada entre los distintos flavivirus. El genoma viral codifica 10 proteínas que son sintetizadas como una poliproteína asociada al retículo endoplásmico rugoso (RER) y que es procesada por proteasas virales y celulares en diferentes etapas del ciclo de replicación (figura 1).<sup>1,15,17</sup>



**Figura 1. Genoma y estructura de las proteínas del virus DEN**

A. ssRNA + del virus y sus regiones a lo largo del marco de lectura. B. Esquema de la poliproteína sintetizada. C. Topología de las proteínas en el RER; los dominios transmembranales se muestran en cilindros blancos y los dominios asociados a la membrana en cilindros grises. Los sitios de corte de la signalasa retículo endoplásmica se marcan con triángulos, el sitio de corte de la proteasa celular furina con flechas blancas y los sitios de clivaje de la NS3 con flechas negras.<sup>3,15</sup>

Hay cuatro serotipos de DEN, muy relacionados entre sí (comparten cerca del 65% de su genoma), aunque inclusive dentro del mismo serotipo puede haber variaciones genéticas; estos serotipos se clasifican como DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 y circulan en áreas endémicas e hiperendémicas, principalmente distribuidos en zonas tropicales y subtropicales como el sur de Asia, América central, el Mediterráneo, el Pacífico occidental y África. Cada serotipo presenta ligeras variaciones en sus proteínas E y M que le confieren propiedades antigénicas diferentes, además se pueden presentar variantes genéticas (genotipos y topotipos), dentro de un mismo serotipo, relacionadas con la virulencia y procedencia geográfica de la cepa.<sup>2,14,17</sup>

Pese a las variaciones genéticas, la infección con cualquiera de los diferentes serotipos de DEN desencadena un cuadro clínico idéntico, fiebre por dengue o simplemente dengue. Cuando una persona es infectada por primera vez, independientemente del serotipo de DEN, tras la resolución de la enfermedad, ésta queda inmunizada de por vida contra el serotipo en particular y por 2 o 3 meses contra el resto de serotipos, por inmunidad cruzada.<sup>3,15</sup> Sin embargo, tras un corto periodo de tiempo el sujeto queda susceptible a nuevas infecciones con los serotipos restantes de DEN. Estas reinfecciones pueden dar origen a reacciones de hipersensibilidad de tipo III principalmente y desembocar en un síndrome de choque tóxico o choque por dengue.<sup>4,14,18</sup>

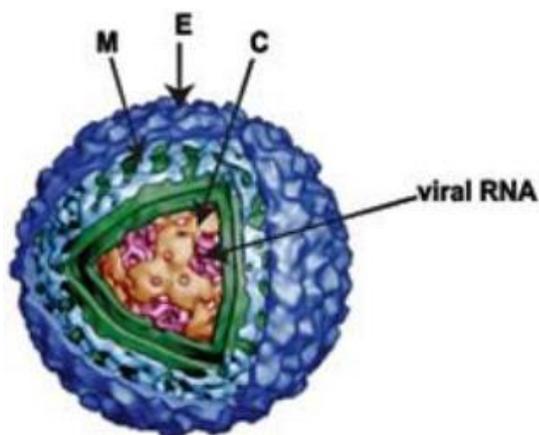
### 1.3.1. Proteínas virales

El genoma viral codifica hacia el extremo 5' para tres proteínas estructurales (C, prM/M y E), constituyen la partícula viral; y hacia el extremo 3' para siete proteínas no

estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), que intervienen durante los procesos de ensamblaje y replicación de vRNA.

#### 1.3.1.1. Proteínas estructurales

Proteína C, denominada de esta forma por ser la proteína que constituye la cápside, también se le denomina proteína *core* o de cubierta, tiene un peso molecular aproximado de 11 KDa; interactúa con las proteínas precursoras de la membrana y de envoltura (prM y E respectivamente) para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales (figura 2). Su estructura secundaria consta de cuatro hélices alfa que cumplen diferentes funciones: las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y anclan la proteína a la membrana del RE.



**Figura 2. Virus del dengue**

Estructura general del virión del dengue, con la localización de las 3 proteínas estructurales C, M y E.<sup>2</sup>

La hélice 1, ubicada en el extremo N-terminal de la proteína y orientada hacia el citoplasma, posee aminoácidos de carácter básico (K, R y H) que se asocian y unen al RNA viral recién sintetizado; de esta manera, se forma el complejo riboproteico o nucleocápside que organiza el RNA viral en el interior del virión en formación y lo

protege de la degradación. La nucleocápside se estabiliza por la interacción de varios homodímeros antiparalelos de la proteína C, que rodean con gran afinidad y especificidad el RNA viral.

La hélice 2 de naturaleza hidrofóbica, interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína actuando como una bisagra que favorece el acercamiento del RNA viral al resto de la proteína C anclada a la membrana del RE. También ejerce una función de reclutamiento de pequeñas gotas lipídicas (*lipid droplets*), presentes en el citoplasma y que promueven la formación del virión en los viroplasmos. Además, la proteína de la cápside anclada en el retículo endoplásmico interactúa con las proteínas precursora de membrana y de envoltura, para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales.

La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular aproximado de 26 KDa y se presenta en viriones inmaduros; participa en el proceso de maduración de la partícula viral. La proteína de membrana (M), cuyo peso molecular es de alrededor de 8 KDa, se origina de la escisión del péptido pr en la proteína prM. La proteína M tiene dos dominios transmembranales y un ectodominio de 40 aminoácidos, aproximadamente, que puede inducir apoptosis en diversas líneas celulares a través de su dominio apoptoM.<sup>15</sup>

Por último, la proteína de envoltura E, es una glicoproteína con un peso molecular de 50 KDa, posee tres dominios denominados I, II y III. Se distribuye sobre la superficie del virus, formando complejos homodiméricos de tipo cabeza cola, que son los principales inmunógenos del virus. Los dominios I y II son determinantes para las interacciones y cambios conformacionales que permiten al virus ser liberado en el

citoplasma celular durante su ciclo de replicación; mientras el dominio III se considera el responsable de la interacción específica entre el virus y los receptores de las células diana (células dendríticas, endoteliales, monocitos, macrófagos, hepatocitos, principalmente), lo que favorece la endocitosis del virus.<sup>1,15,19</sup>

#### 1.3.1.2. Proteínas no estructurales

La proteína NS1 (de aproximadamente 46 KDa) forma dímeros o hexámeros asociados a las balsas lipídicas (*rafts*) de la membrana plasmática y aunque su función específica no se ha llegado a definir, se sabe que tiene un papel importante en el proceso de replicación viral.<sup>20,21</sup> También se puede hallar soluble en el citoplasma y en la matriz extracelular, por lo que también es un inmunógeno, característico de algunos virus de la familia *Flaviviridae*.<sup>17</sup>

NS2A, es una proteína de alrededor de 22 KDa, que *in vitro*, promueve el ensamblaje y replicación viral; se cree que es responsable de coordinar si el ssRNA+ recién sintetizado en cada ciclo de replicación viral se utiliza como molde para generar las nuevas formas replicativas (ssRNA-) e intermediarios replicativos (traducido en proteínas virales) o si se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje del virión. Por su parte, NS2B (de aproximadamente 14 KDa), posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del RE el complejo NS2B/NS3 y que por un procesamiento proteolítico libera su dominio hidrofílico, que interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 (de 70 KDa aproximadamente), dándole estabilidad y actuando como cofactor de su dominio proteasa (NS3pro).

NS3 es una proteína bipartita que posee un dominio proteasa similar a la tripsina (NS3pro), en su extremo N-terminal y un dominio con actividades enzimáticas de

trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA (NTPasa) y RNA helicasa (NS3Hel). NS3Pro hidroliza los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5. También se ha encontrado que NS3 se encarga de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del RE, reclutando enzimas celulares responsables de la lipogénesis y se ha sugerido que puede participar en el proceso de ensamblaje y transporte intracelular de los flavivirus (tráfico viral).<sup>15</sup>

NS4A es un polipéptido de 54 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 8 KDa; posee tres dominios: uno central que forma un complejo estable con NS3 a través de la interacción con su dominio NS3Pro, para el eficiente procesamiento de las proteínas no estructurales (favoreciendo su estabilidad y su actividad serin proteasa dependiente de Zn);<sup>22,23</sup> un segundo dominio de tipo hidrofóbico en el extremo N-terminal es responsable de la inserción de la proteína en membrana y el reclutamiento de NS3; por último, el tercer dominio de tipo ácido en el C-terminal involucrado en la replicación del vRNA.<sup>24</sup>

NS4B es una proteína muy hidrofóbica de aproximadamente 27 kDa, se integra en la membrana del retículo endoplásmico e induce una alteración en la membrana, conocida como red membranosa, que sirve como sitio para la formación del complejo viral de replicación.<sup>23</sup>

Por último, la proteína NS5 es la más conservada entre todos los flavivirus y es multifuncional, ya que en el extremo N-terminal posee actividad enzimática metil transferasa y guanidil transferasa, responsables del *capping* y la metilación del extremo 5' del RNA viral; mientras que en el extremo C-terminal se ubica el dominio RNA

polimerasa dependiente de RNA (RdRps). Actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción viral.<sup>15</sup>

### 1.3.2. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación comienza con la entrada del virus en las células diana (por lo general las células dendríticas son las primeras en ser infectadas en el humano<sup>1</sup>). Aunque los mecanismos generales de entrada del DEN a las células son por unión de complejos virus-anticuerpo (formados en concentraciones subneutralizantes de anticuerpo), a células con el Fc-R; y por unión de la glicoproteína E a la membrana celular. Ambos mecanismos cursan de manera similar una vez producida la internalización a la célula; una vez internalizado, la proteína E interactúa con proteoglicanos (como el heparán sulfato) y otras proteínas (como el receptor para laminina LAMR1, la proteína de adhesión celular ICAM-3, DC-SIGN o CD209) de la membrana celular que median la unión y endocitosis, dependiendo del serotipo viral. Se ha propuesto que los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular o asociados a las proteínas de superficie, por su alta carga negativa, pueden actuar como receptores primarios favoreciendo el acercamiento de las partículas virales a la superficie celular para permitir la interacción de la proteína E con los respectivos receptores capaces de inducir la endocitosis viral.<sup>25</sup>

La endocitosis es dependiente de las clatrininas celulares, que promueven la formación de la vesícula endocítica que posteriormente se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en uno tardío, que se fusiona con un lisosoma lo que acidifica el pH de la vesícula (ahora fagolisosoma), e induce cambios conformacionales en la proteína E, favoreciendo la exposición y anclaje de la proteína completa por medio

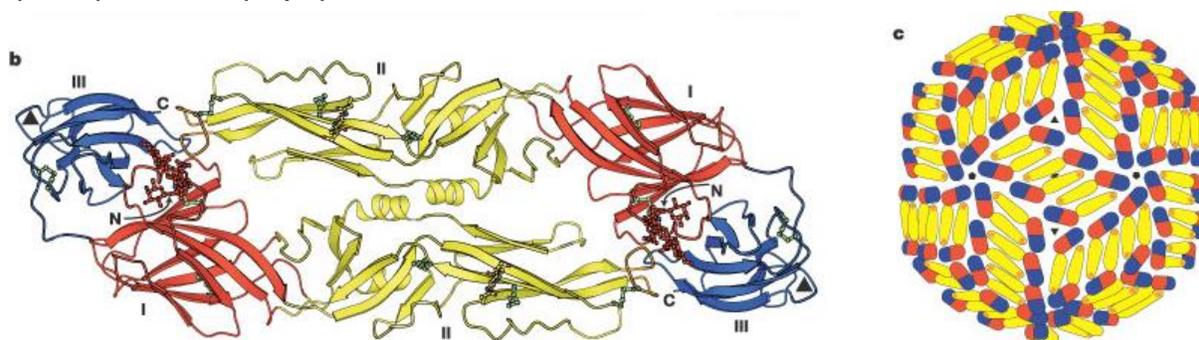
de su dominio II de fusión a la membrana de la vesícula, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma.<sup>15,19</sup> Para que la nucleocápside sea liberada del endosoma éste debe estar inmerso en el citoplasma donde el cambio de pH le permite adquirir una carga neta negativa y favorece la interacción y fusión de la membrana viral con la del endosoma.<sup>4</sup>

Cuando la nucleocápside se halla libre en el citoplasma, el material genético viral se libera e inicia su traducción y replicación en el RER. El polipéptido viral recién sintetizado es procesado en el RE por proteasas celulares y virales, liberando de forma ordenada las proteínas estructurales y no estructurales encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral.

Durante la traducción del genoma viral, el polipéptido recién sintetizado es acompañado por las chaperonas BiP, calnexina y calreticulina. Cada una de las proteínas virales se organiza en la membrana del RE y se procesa por diferentes proteasas (figura 1), para finalmente ser sometidas al proceso de modificación postraduccional (plegamiento y glucosilación).

El proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del RNA viral y la proteína C en presencia de pequeñas gotas de lípidos (*rafts*), en un complejo denominado viroplasma; posteriormente, sobre esta primera estructura se asocian las proteínas prM/M y E, que deben estar inmersas en la membrana del RE. A continuación suceden varias etapas de maduración de la partícula viral: primero las proteínas prM/M y E, se organizan de forma heterodimérica, en donde la primera recubre a la segunda; este recubrimiento le confiere un aspecto rugoso a la superficie del virus cuando se observa por microscopía electrónica.

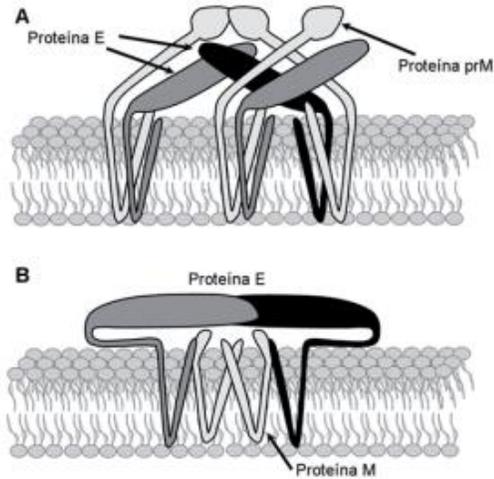
La partícula viral inmadura transita desde el RE donde adquiere su membrana lipídica, hasta las regiones *cis* y *trans* del aparato de Golgi, donde se inicia su maduración y ocurren procesos como la glicosilación de proteínas, los cambios de conformación y de rotación de la proteína E, que generan homotrímeros anti paralelos de la misma, lo que ahora le da una apariencia lisa a la superficie del virus. Finalmente, el virus viaja en vesículas de secreción, dentro de las cuales un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM por la proteasa furina independiza el péptido pr y la proteína M, lo que permite estabilizar los homotrímeros de E (figura 3) sin separar al péptido pr del complejo proteico, hasta la liberación del virus fuera de la célula.



**Figura 3. Estructura de la proteína E**

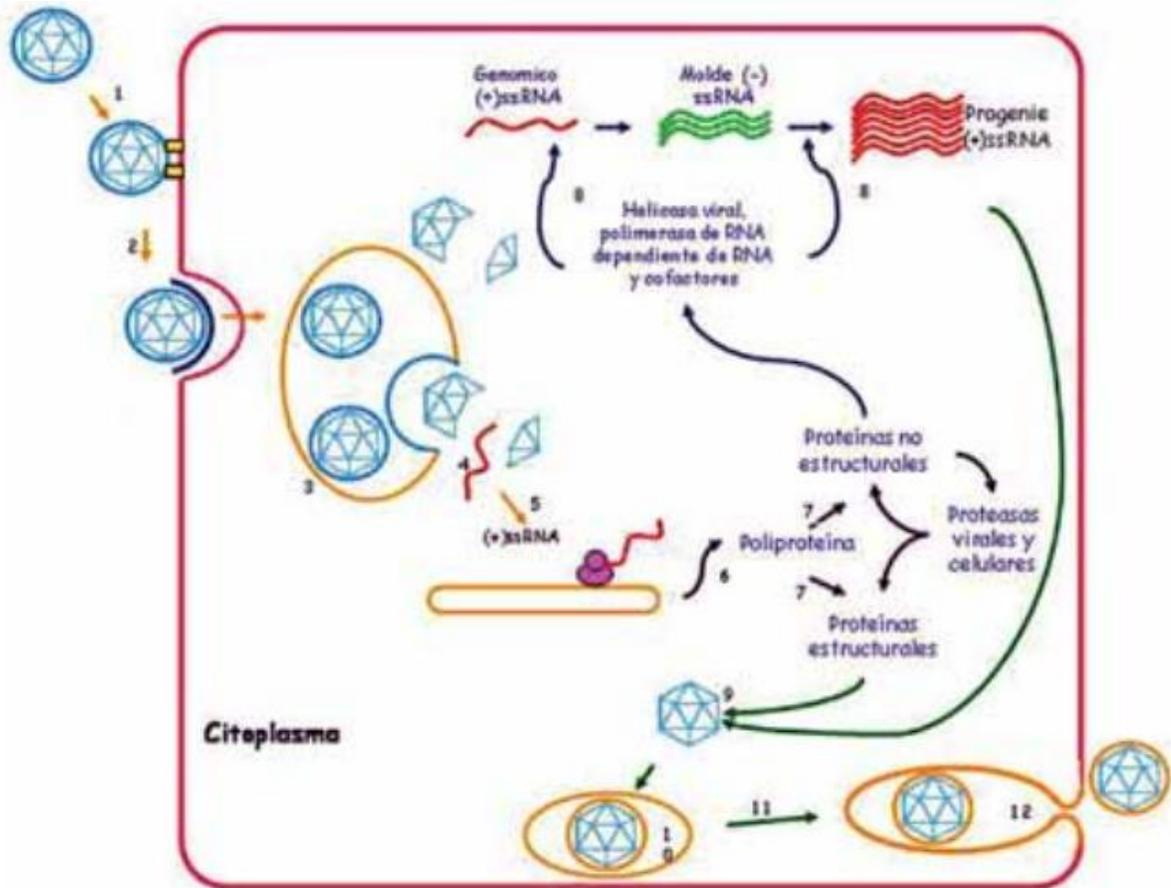
La estructura terciaria de la proteína E está conformada por los dominios I, II y III que al madurar la partícula viral se organizan en homotrímeros sobre la membrana lipídica.<sup>26</sup>

Cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extracelular induce el desprendimiento del péptido pr del complejo y la proteína E adquiere la conformación final que puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la células sensibles e iniciar un nuevo ciclo de infección (figuras 4 y 5).<sup>15,17,27</sup>



**Figura 4. Esquema de los cambios estructurales de las proteínas E y prM/M**

A) durante el ensamblaje en el RE y en B) virus maduros detectados en el espacio extracelular. El clivaje final de la prM es catalizado por la proteasa celular furina, liberando el fragmento pr y permitiendo la reacomodación de la glucoproteína E.<sup>15</sup>



**Figura 5. Ciclo replicativo del DEN**

1) el virus se une a la célula huésped, 2) interacciona con su complejo receptor, 3) entra a través de las vesículas, 4) fusión de la membrana viral, 5) liberación del genoma viral, 6) el RNA es traducido, 7) la poliproteína es procesada por proteasas virales y celulares, 8) replicación del RNA, 9) las cadenas de polaridad positiva son empaquetadas en las cápsidas recién sintetizadas, 10) el virus adquiere su membrana lipídica, 11) se libera por exocitosis y 12) la proteína M termina su maduración y se libera el péptido pr.<sup>1</sup>

### 1.3.3. Patogenicidad y virulencia

La morbilidad y mortalidad causadas por el DEN, están dadas por la complejidad de eventos que se presentan en el transcurso de la infección. Las principales células diana son los monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos CD4+ y CD8+, aunque *in vitro* se ha reportado que se infectan células del endotelio, varias líneas celulares hepáticas, fibroblásticas y neuronales. Una vez establecida la infección en el huésped, las células expresan como primera línea de defensa son los interferones (INF) de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que busca inhibir la replicación viral. Por otro lado, se inicia el proceso de presentación de antígenos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de tipo I (para Ag endógenos) y II (para Ag exógeno), lo que conlleva a que células como las *Natural Killer* (NK) ataquen a las células infectadas y liberen, junto a los linfocitos T, el INF de tipo II ( $\gamma$ ), con lo que se establece el control de la infección, ya que se propicia un estado antiviral mediado por INF que evita la replicación del virus en las células infectadas o la infección de nuevas células. Además, este proceso de señalización puede inducir la apoptosis de las células infectadas o alteradas por acción de las NK liberando factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).<sup>15,18,28</sup>

Por otro lado, los linfocitos T desempeñan un papel preponderante en el establecimiento y control de la respuesta inmunitaria frente al virus. Tanto los linfocitos CD4+ como los CD8+ estimulados por diferentes citocinas, como los diversos INF y el TNF- $\alpha$ , se activan y secretan citocinas de carácter tanto proinflamatorio como antiinflamatorio. Esta respuesta inmunitaria es la que normalmente se presenta en los pacientes infectados por primera vez que logran resolver la infección; sin embargo, en los pacientes que sufren una nueva infección con un serotipo diferente al que causó la

primera (frecuente en zonas endémicas donde circula más de un serotipode DEN como México<sup>4</sup>), ocurre una reacción de hipersensibilidad de tipo III, aumentando las probabilidades de que desarrolle dengue grave, con manifestaciones hemorrágicas o sin ellas.<sup>15</sup>

En esta reacción de hipersensibilidad tipo III se da una potenciación de la infección dependiente o mediada por anticuerpos<sup>27</sup>, que se presenta por la reacción cruzada entre los anticuerpos (Ab) inducidos en la primera infección, que reconocen y forman complejos con el segundo serotipo de virus causante de la reinfección. Usualmente se trata de complejos solubles y circulantes formados por un exceso de antígenos (Ag) virales. Estos complejos virus-Ab se unen a los monocitos y macrófagos mediante los receptores de la fracción constante de los Ab (RFcy), favoreciendo la penetración del virus, también se depositan en tejidos de concentración sanguínea o plasmática como el endotelio vascular, membranas sinoviales, plexos coroideos, membrana basal de glomérulos renales, etc., que también expresan los RFcy, los complejos participan fijando complemento, induciendo el incremento de la permeabilidad vascular, extravasación plasmática (lo que ocasiona edemas y eritemas) e inflamación (que conlleva a daño tisular), por acción de C1, C3a, C4a y C5a; así como inducir el reclutamiento de neutrófilos (Ne) que fagocitan los complejos depositados, liberando especies reactivas de oxígeno (ROS), hidrolasas y otras enzimas de los gránulos lisosomales liberados. Lo anterior, sumado a la actividad citolítica del complemento lleva a un daño tisular que puede llevar a falla sistémica dependiendo el sitio en el que ocurra, hemorragia, etc.<sup>15,18</sup>

Este mecanismo incrementa la proporción de células infectadas, la viremia y la capacidad de dispersión del virus en el organismo debido a que factores como la secreción de INF- $\gamma$ , aumenta la expresión de ICAM-1 y moléculas de adhesión como VCAM-1, E, L y P-selectina (activadoras del endotelio vascular), que no solo facilitan la penetración del virus a las células sino que ayuda a que macrófagos, monocitos, neutrófilos y otras células se activen y movilicen hacia el área de mayor concentración viral, permitiendo así la propagación del virus a otros tejidos.

Por otra parte, se han reportado casos de menores de un año de edad, que presentan signos de dengue grave al ser infectados por primera vez, esto debido a la presencia de anticuerpos transmitidos por inmunización pasiva. También se sabe de casos de dengue grave con manifestaciones hemorrágicas en pacientes infectados por primera vez, lo que sugiere que el desarrollo de estas manifestaciones puede ser inherente a factores propios del paciente, como la edad, el sexo, factores genéticos, como la raza y algunos polimorfismos asociados a los genes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA), al TNF- $\alpha$ , y al CD209, aunque de igual manera se cree que el serotipo y las variaciones genéticas de los virus pueden estar relacionadas a su vez con las implicaciones de dichos factores inherentes al paciente.

Otro mecanismo que se ha asociado al desarrollo de dengue grave, es la lisis de las células endoteliales, mediada por complemento y dependiente de Ab dirigidos contra NS1, que presentan reacción cruzada con un antígeno aún no identificado presente en la superficie del endotelio. Por otro lado, la gravedad de la enfermedad puede deberse a las grandes concentraciones y a la constante permanencia de algunas de citocinas liberadas por linfocitos, macrófagos y células endoteliales, entre otras.

Algunos de los mediadores solubles que se han detectado en pacientes infectados con DEN, son las citocinas de tipo Th1 (IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-3 y GMCSF) y Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, GMCSF y TGF- $\beta$ ), secretadas por linfocitos CD4+ o CD8+. Particularmente en pacientes con diagnóstico de dengue sin signos de alarma, se detectan citocinas de tipo Th1 (principalmente IFN- $\gamma$  e IL-2), mientras que, en los pacientes con dengue grave, se detectan las citocinas de tipo Th2. La presencia de IL-8 en grandes concentraciones en el suero de pacientes con dengue grave se asocia con un aumento en la permeabilidad vascular, la efusión pleural y la muerte.<sup>15,18,28</sup>

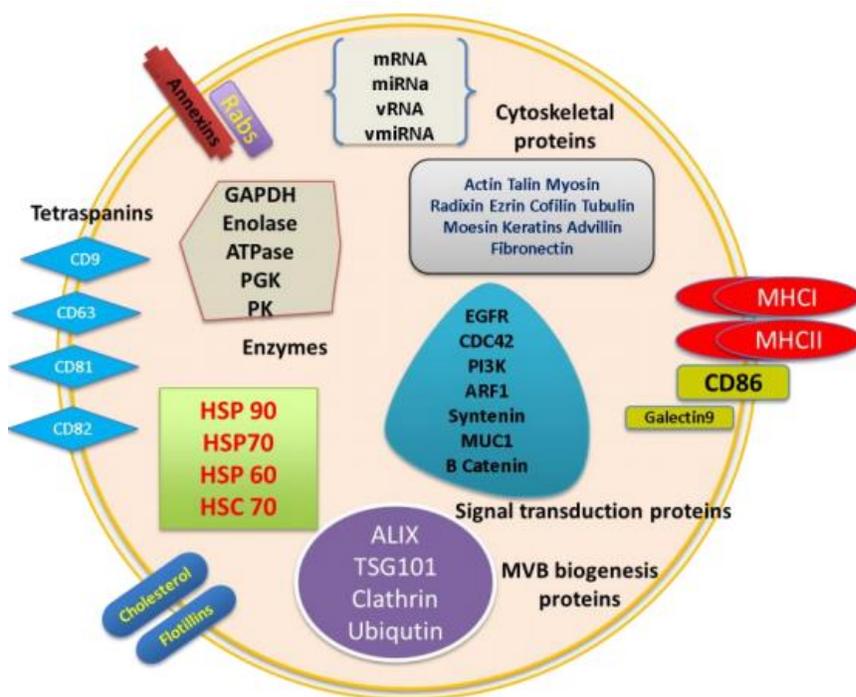
El aumento de casos de dengue con manifestaciones atípicas, como miocarditis, encefalitis, hepatitis o insuficiencia renal, sugiere cambios en el perfil de la enfermedad que podrían deberse a cambios en el tropismo del virus; esto último muestra la necesidad de conocer más sobre el virus y los posibles mecanismos que emplea para infectar diferentes estirpes celulares y tejidos.<sup>1,15</sup>

#### 1.4. Exosomas

Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana (40-100 nm<sup>11</sup>) que se forman a partir de los compartimentos del endosoma tardío, por la invaginación de la membrana limitante al lumen. Estas vesículas internas se acumulan en el endosoma formando la estructura denominada cuerpo multivesicular (MVB), cuyo contenido está íntimamente relacionado con el estado fisiológico y patológico de las células en que se encuentran debido a la absorción de material citoplasmático durante su formación. Estos MVB pueden tener un curso degradativo, convirtiéndose en lisosomas regulados por la proteína ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*, Complejos especiales requeridos para el transporte de endosomas) o por ubiquitinación, o bien,

estos MVB pueden ser exocitados. Cuando ocurre esto último, los MVB se fusionan a la membrana plasmática y su contenido es liberado al exterior.<sup>11,29,30</sup>

Debido a su origen endosomal, todos los exosomas poseen proteínas comunes de transporte y fusión, tetraspaninas, HSP (Heat Shock Proteins), proteínas formadoras de MVB, además de abundantes fosfolípidos de membrana, complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), integrinas, inmunoglobulinas, proteínas de transporte, peptidasas de superficie, etc.(figura 6), su composición depende del tipo de célula que lo originó, su estado fisiológico y los estímulos extracelulares presentes en ese momento.<sup>7,29,31</sup>



### Figura 6. Estructura y composición de un exosoma

Los exosomas tienen una bicapa lipídica derivada de la membrana celular. Contienen entre otros compuestos mRNA, miRNA, DNA y proteínas como anexinas, MHC, proteínas del citoesqueleto, enzimas, proteínas transduccionales, gliceraldehído 3 fosfato, 3-fosfoglicerato quinasa, piruvato quinasa, EGFR, proteína de control de división celular 42 y en casos de infecciones vRNA, vmiRNA, etc.<sup>7</sup>

#### 1.4.1. Función de los exosomas

Se cree que la función de los exosomas es fundamentalmente la de presentación antigénica y sensibilización local de células para la amplificación de la respuesta inmune. Básicamente funcionan para comunicación intercelular y transferencia de proteínas biológicamente activas, lípidos y RNA (mRNA y miRNA principalmente). La internalización del contenido exosomal a una célula se da por la interacción entre los ligandos presentes en las membranas de los exosomas que interactúan de forma específica con los receptores presentes en dichas células.<sup>7,31</sup>

Se ha encontrado que las células dendríticas liberan exosomas con proteínas de funciones específicas para la protección ante el sistema del complemento en las células diana, favorecer la presentación de antígenos o la estimulación de células T. En casos de cáncer se ha detectado que los exosomas pueden contener moléculas que favorecen la aparición de eventos adversos en otras células y que son factibles de emplearse como biomarcadores específicos.<sup>7,31,32</sup>

#### 1.4.2. Marcadores moleculares de exosomas

El proceso de liberación de exosomas es inverso al que siguen cuerpos como los blebs apoptóticos (burbujas apoptóticas) que se liberan por un proceso de *shedding* (derrame o expulsión), dándole a su constitución un repertorio de marcadores similar al de la propia membrana celular.<sup>11</sup> Así los exosomas son únicos en su composición proteica y lipídica, lo que ayuda a facilitar su identificación por biomarcadores. Dentro de su contenido proteico se encuentran proteínas de citoesqueleto como actinas, cofilina 1, profilina 1, tubulina, etc.; proteínas transmembranales como PIGR (Receptor Polimérico de Inmunoglobulinas),

LAMP1(Proteína de Membrana asociada lisosomal) y CD59 (Inhibidor membranal de lisis reactiva o Proteína Inhibidora de MAC); enzimas como enolasas, aldolasas, LDH (Lactato Deshidrogenasa), ciclofilina A, peroxirredoxinas, etc.; reguladores transcripcionales; tetraspaninas como CD9, CD63 y CD81; entre otras, dependiendo del origen celular de los exosomas y estado fisiológico de las mismas.<sup>11,31,33</sup>

Pese a estas diferencias, se han identificado proteínas constitutivas que están presentes en la mayoría de los casos como aquellas relacionadas con la biogénesis de los MVB, como Alix (identificada en el 68% de los ensayos), TSG101 (37%), entre otras.<sup>11</sup>

#### 1.4.3. Exosomas y RNA virus

Estudios recientes han demostrado que los exosomas liberados de células infectadas con RNA virus como HIV, HCV, HTLV y DEN, contienen y liberan diversos factores reguladores como vRNA, proteínas virales, y miRNA's tanto celulares como virales, entre otros elementos genéticos reguladores propios de la célula hospedera, todos éstos componentes la ayudan a establecer una infección productiva y modular la respuesta inmune, es decir, los exosomas pueden tanto diseminar como limitar una infección, dependiendo del tipo de patógeno y las células diana, lo que los hace buenos candidatos para el desarrollo de antivirales y vacunas.<sup>7</sup>

Pese a lo que se podría pensar, las diferentes clases de RNA encontrados dentro de los exosomas sugiere que el empaquetamiento de material genético en los mismos es un proceso regulado y no aleatorio debido a su variación dependiendo del estado fisiológico de la célula y la presencia de estímulos hormonales, químicos y estados patológicos, entre otros.<sup>7,12,34,35</sup>

### 1.5. micro RNA

Los miRNA's son pequeños RNA's de una sola hebra (de entre 20-25 nt de longitud), no codificantes, que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional<sup>36</sup>; pertenecen al grupo de RNA's de interferencia (iRNA's) que son secuencias específicas y participan de manera importante en la respuesta celular contra infecciones virales y regulación de expresión genética en diferentes estados fisiológicos, como en el avance del ciclo celular, cáncer, diabetes, etc. Los miRNA's se diferencian de los siRNA's porque éstos últimos son procesados de diferentes fuentes de RNA doble hebra.<sup>37</sup>

Se ha detectado que los virus tanto de humanos como de plantas codifican proteínas o RNA's dentro de cuya función se encuentra la supresión o modulación de los propios iRNA's, por diversos mecanismos, como la proteína NS1 del virus de la influenza A (relacionada con la NS1 del DEN), la proteína TAT (*Trans-Activator of Transcription*, Tran-activador de la transcripción) del HIV (Virus de Inmunodeficiencia Humana), la proteína de la cápside del virus de la hepatitis C, entre otros.

Algunos miRNA's ejercen su acción alterando el proceso de edición de otros iRNA interviniendo en la acción de enzimas como Dicer, Drosha, Ago1 y Ago2 (Componentes 1 y 2 catalíticos argonautas de RISC). A su vez se han identificado proteínas como la NS4B del DEN, que son capaces de inhibir la acción de los iRNA<sup>38</sup>, lo que favorece la teoría de que estos factores ayudan por un lado a los virus en su diseminación y a mantenerse en replicación constante, aunque por otro lado en algunos casos la expresión de miRNA's se relaciona con respuestas celulares de fines antivirales como la inducción de la expresión de INF de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ).<sup>36</sup>

### 1.5.1. Síntesis de miRNA's

La síntesis de miRNA's tiene diferentes variaciones dependiendo de si se da en células animales o vegetales. En el caso de mamíferos, comienza con la transcripción de un miRNA primario (pri-miRNA)<sup>39</sup>. Estos genes son principalmente transcritos por la RNA polimerasa II; el pri-miRNA recién sintetizado es extenso (de cientos a miles de nucleótidos), posee una región cap, una cola poliA y se acomoda espacialmente en forma de bucle u horquilla.<sup>37</sup>

Los pri-miRNA's son procesados en el núcleo por la enzima Drosha<sup>39</sup>, en conjunto con DGCR8 forma el complejo de microprocesamiento que realiza un corte en la base de la horquilla, lo que resulta en un RNA de 60-100 nt, conocido como pre-miRNA<sup>40</sup>. En este complejo de microprocesamiento, DGCR8 interactúa con el segmento de una sola hebra de RNA en el pri-miRNA y guía a Drosha para realizar el corte aproximadamente 11 pb por encima de la sección de una hebra. El pre-miRNA resultante, posee un grupo fosfato libre en su extremo 5' y una sección sobresaliente en el extremo 3' de 2 a 3 nt.<sup>41,42</sup>

El pre-miRNA es transportado a través de los poros nucleares hacia el exterior, por acción de la exportina 5 que reconoce una región de más de 14 pb en el RNA de doble hebra con el sobresaliente 3'.

Finalmente, el pre-miRNA es cortado por la endonucleasa Dicer en el citoplasma, lo que origina el miRNA maduro.<sup>37,39</sup>

### 1.5.2. Mecanismo de acción de los miRNA's

Los miRNA's juegan un papel clave en la regulación de la expresión genética. Posterior a la edición final del miRNA, por Dicer, esta enzima se asocia a proteínas argonautas (Ago) y otras como la proteína enlazadora de RNA en respuesta a trans activación (TRBP), algunas quinasas y el activador dependiente de RNA de doble hebra inducible por interferones (PACT). Estas proteínas en conjunto contribuyen a la formación del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), formando el complejo de carga de RISC (RLC).<sup>10,43,44</sup> Esto ocurre cuando el miRNA recién cortado en sus extremos se incorpora en un complejo proteico de la familia Ago, lo que genera un complejo efector. En la mayoría de los casos, una de las hebras (hebra pasajera) es degradada en el complejo (por acción de las proteínas Ago<sup>45</sup>) y la otra permanece como miRNA maduro, aunque en algunos casos el miRNA pasajero permanece en el complejo RISC y se vuelve funcional. Después de la carga, la complementariedad del miRNA, guía al RISC hacia el punto blanco del mRNA. La principal estrategia de acción de los miRNA's es considerada la interacción con el extremo 3' UTR de los mRNA, lo que por lo general conlleva a la inhibición de la traducción de los mismos por degradación del mRNA o represión directa de la traducción.<sup>37</sup>

El complejo miRNA-RISC (miRISC) contiene factores heterogéneos de reconocimiento de RNA que facilitan el reconocimiento de los mRNA y la represión específica de la traducción. Se cree que el grado de complementariedad del miRNA con su mRNA es determinante en la vía de represión de la traducción, en los casos en que la interacción o apareamiento es completo, se puede propiciar la degradación del mensajero catalizada por las proteínas Ago, o bien propiciando el decapping y

desadenilación; pero cuando existen zonas de baja complementariedad se originan estructuras secundarias que ocasionan la represión de la traducción por interferencia con el complejo ribosomal, interactuando con los factores iniciadores (IF) o los factores de elongación (EF).<sup>39</sup>

Los miRNA's también pueden incrementar la traducción del mRNA diana, favoreciendo el reclutamiento de los complejos proteicos de traducción en las regiones ricas en adenina y uracilo en el propio mRNA, o indirectamente incrementar la producción de una proteína reprimiendo la represión de la traducción del mRNA, interactuando con las proteínas que bloquean dicha traducción. También se ha descubierto que los miRNAs pueden aumentar la producción general de proteínas aumentando la biogénesis de ribosomas.<sup>37</sup>

A su vez, se sabe que los miRNA's pueden interactuar con las células próximas o lejanas al punto donde son liberados, en una acción similar a la de una hormona interactuando con diversos receptores como el TLR, afectando así la expresión genética.<sup>46</sup>

#### 1.6. miRNA's y exosomas

Los miRNA's pueden ejercer su acción al ser liberados de las células que los producen por múltiples vías, entre ellas asociados a HDL y exosomas. Al ser transportados por diferentes vías, cuentan con diversos mecanismos que les permiten llegar a cualquier tipo de célula y ejercer su acción.<sup>37,47</sup>

Se han realizado diversos estudios que han permitido la identificación de familias específicas de miRNA's involucrados en procesos fisiológicos normales de las células y a su vez liberados en exosomas de manera normal para comunicación intercelular.<sup>13</sup> Así

se ha llegado a establecer un perfil aproximado de los miRNA's que se encuentran de forma constitutiva o que son constantemente expresados y liberados en exosomas, en la mayoría de los casos y linajes celulares. Su uso común es como control de ensayos de expresión y validación de microarreglos (Cuadro 1).<sup>46</sup>

**Cuadro 1.** MiRNA's constitutivos de exosomas<sup>48-50</sup>

miRNA	
miR-200c	miR-17
miR-106a	let-7e
let-7f-2-3p	miR-122
miR-124-3p	miR-1248
miR-129	miR-142-3p
miR-222	miR-376c
miR-409-3p	miR-432
miR-451	miR-99a-5p
miR-128	miR-124-3p
miR-181b-5p	miR-125b-5p
miR-100-5p	miR-99b-5p
miR-16	

Se han logrado identificar alteraciones en la expresión de algunos de los miRNA's analizados en diferentes estados fisiológicos de las células, y que están presentes en los exosomas en la mayoría de los casos. También se ha encontrado la presencia de miRNA's que de manera normal no tienden a expresarse o cuya expresión es mínima en las células y no se encuentran generalmente en exosomas.

Por ejemplo, se ha identificado que algunos miRNA's como miR-146a son inducidos por la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y a su vez favorecen la diseminación del DEN en nuevas células. También se ha identificado que este miRNA reduce la liberación de INF, disminuyendo respuesta antiviral en el organismo. Otros miRNA como miR-29c son inhibidores de moléculas antiapoptóticas,

por lo que su presencia favorece la muerte celular y complica los cuadros clínicos en las infecciones virales.<sup>12</sup>

Por otro lado, también se ha observado que la presencia de miRNA's en los exosomas tiene efectos antivirales, por ejemplo, se ha identificado que los miRNA's de la familia let-7c regulan el aumento del estrés oxidativo (EO) en la respuesta celular ante infecciones con DEN2 y DEN4. Cabe resaltar que, aunque se han identificado múltiples miRNA's relacionados con DEN y otros virus, la función exacta de la mayoría aún es desconocida, aunque existen múltiples sistemas de predicción de blancos moleculares que permiten deducir el efecto y blanco de acción de los miRNA por su secuencia.<sup>22,51</sup> En el cuadro 2 se pueden observar algunos miRNA's característicos liberados en exosomas de células infectadas por DEN, así como la alteración en expresión que presentan durante la misma infección.<sup>7,34</sup>

**Cuadro 2.** Perfil de expresión de algunos miRNA's en casos relacionados con DEN

miRNA		Expresión	
miR-19a-3p	miR-584-5p	Sobreexpresados en todos los casos de DEN dentro de las primeras 2 semanas de infección <sup>9,52</sup>	
miR-19b-3p	miR-614		
miR-33b-5p	miR-634		
miR-145-3p	miR-652-3p		
miR-299-3p	miR-4451		
miR-320a	miR-4503		
miR-374a-5p	miR-4529-3p		
miR-423-3p	miR-4788		
miR-548e	miR-5583-5p		
miR-30e			Sobreexpresado durante la infección con DEN en células monocíticas U937 <sup>53</sup>
miR-576-5p		Inhibido en todo momento durante la infección con DEN <sup>9</sup>	
miR-218-5p	miR-649	Sobreexpresados solamente durante la fase aguda de la infección por DEN (primeros 4 días) <sup>9,51</sup>	
miR-296-5p	miR-892b		
miR-450b-5p	miR-1181		
miR-499a-5p	miR-1204		
miR-512-3p	miR-1225-5p		
miR-520d-3p	miR-1277-3p		
miR-520g	miR-3937		
miR-524-3p	miR-4259		
miR-544a	miR-4327		
miR-548h-5p	miR-4446-5p		
miR-615-5p	miR-4525		
miR-624-5p	miR-4640-3p		
miR-625-3p			Expresados de forma natural en pacientes sanos y aquéllos recurados de la infección con DEN <sup>9,48,51</sup>
miR-99b-5p	miR-491		
miR-499a-3p	miR-1273c		
miR-3121-3p	miR-3591-3p		
miR-4423-3p	miR-4434		
miR-4444	miR-4490	Inhibidos durante la infección con DEN <sup>9</sup>	
miR-4501	miR-4694-3p		
miR-4695-5p	miR-5000-5p		
miR-5004-3p	miR-5004-5p		
miR-4640-3p	miR-3158-5p	Sobreexpresados solo en casos de infección con DEN que presentan complicaciones hepáticas <sup>9</sup>	
miR-24-1-5p	miR-624-5p		
miR-512-5p	miR-890		
miR-15a-3p	miR-34b-3p		
miR-122-5p	miR-138-1-3p		
miR-218-2-3p	miR-3137		
miR-4301	miR-4436b-5p		
miR-4694-3p	miR-663a	Sobreexpresado durante las primeras 12 h de infección con DEN, con reducción gradual de expresión <sup>34</sup>	
let-7c	miR-149		
miR-92b	miR-181c	Sobreexpresados en pacientes infectados con DEN <sup>251</sup>	
miR-4290	miR-4279		
miR-1200	miR-33a		
miR-378a	miR-1246		
miR-767-5p	miR-320c		

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los virus de mayor relevancia clínica en la actualidad es el virus del dengue (DEN), considerado como el arbovirus con el mayor número de casos anuales a nivel mundial y de mayor riesgo para la población.<sup>3,17</sup> De los millones de casos anuales de DEN en el mundo, al menos medio millón evoluciona a la patología hemorrágica conocida como dengue grave o hemorrágico, con un desenlace fatal en al menos el 2.5% de los infectados; hasta la fecha no se cuenta con una vacuna viable o cura para el DEN<sup>1,3</sup>, por lo que los esfuerzos de la ciencia para enfrentar esta enfermedad se han basado en encontrar tratamientos eficaces contra la sintomatología producida por la infección y control de vectores de transmisión. Sin embargo, un enfoque que ha resultado más prometedor en los últimos años con los avances de la investigación en Biología Molecular, consiste en la prevención de la infección a través de la detección de factores genéticos que predisponen a la misma y la búsqueda de biomoléculas que puedan inhibir o intervenir en el progreso de la infección viral como miRNA's de las propias células infectadas<sup>31</sup>, con base en el hecho de que las infecciones virales son un factor que alteran la expresión genética de diferentes maneras en los organismos.

Algunas de las alteraciones de expresión genética en personas infectadas con virus están relacionadas con miRNA's que son transportados en exosomas de una célula a otra. En múltiples investigaciones se han identificado posibles miRNA's, cuya expresión puede ser alterada durante el proceso de infección con DEN<sup>9,48,51</sup>; esta investigación se realizó con la finalidad de identificar si estas alteraciones de expresión también están presentes en el cargamento de exosomas liberados por las células

infectadas y comparar cuantitativamente la diferencia de expresión entre los miRNA's derivados de exosomas de estas células, con los provenientes de células no infectadas con Dengue serotipo 2 (DEN2) a diferentes tiempos de infección, empleando qRT-PCR.

### III. HIPÓTESIS

Se ha identificado a nivel celular y en plasma de pacientes infectados con DEN, que la expresión de los miRNA's puede ser alterada durante el proceso infeccioso<sup>9,51</sup> además que algunos de éstos a su vez están presentes en exosomas,<sup>13,48</sup> por lo que es posible que también exista una diferencia en el perfil de expresión de los miRNA's presentes en exosomas derivados de células monocíticas infectadas y no infectadas con DEN2, cuya variación con el tiempo podría ser significativa y comparable cuantitativamente por qRT-PCR.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar por qRT-PCR la diferencia en el perfil de expresión de tres miRNA's presentes en exosomas liberados por células monocíticas U937 DC-SIGN infectadas y no infectadas con DEN2.

### 4.2. Objetivos específicos

- Extraer los miRNA's presentes en exosomas aislados del sobrenadante de medios de cultivo de células monocíticas U-937DC-SIGN infectadas y no infectadas (Mock).
- Identificar con base a los datos obtenidos por amplificación con qRT-PCR si hay una diferencia significativa en los perfiles de expresión los miRNA's extraídos.
- Identificar estadísticamente si la diferencia de expresión de los miRNA's puede tener relación con el tiempo de infección.
- Analizar las implicaciones de los cambios de expresión de los miRNA's evaluados, a través de sus posibles mRNA blanco.

## V. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.1. Tipo de estudio:

El estudio desarrollado fue de tipo experimental, en donde se evaluó la expresión de miRNA's específicos extraídos de exosomas aislados de células monocíticas U-937 infectadas y no infectadas con DEN2 (Mock), por qRT-PCR.

### 5.2. Población de estudio

Se analizaron tres miRNA's de exosomas de células monocíticas U-937 infectadas y no infectadas (Mock) con DEN2 para comparar sus cambios de expresión en ambos estados. Considerando un miRNA constitutivo de exosomas (reportado como siempre presente en los exosomas)<sup>54</sup> y cuya expresión a la fecha no se haya reportado como alterada durante las infecciones con DEN, a manera de control; un miRNA cuya expresión se haya reportado de igual manera como alterada durante la infección con DEN, sin ser constitutivo de exosomas<sup>50,52</sup>; y un miRNA cuya expresión solo se haya reportado en casos de infección con DEN.<sup>12</sup>

### 5.3. Variables

#### 5.3.1. Independientes

- Concentración de virus y serotipo empleado
- Tiempo de infección

#### 5.3.2. Dependientes

- Expresión de miRNA's en exosomas

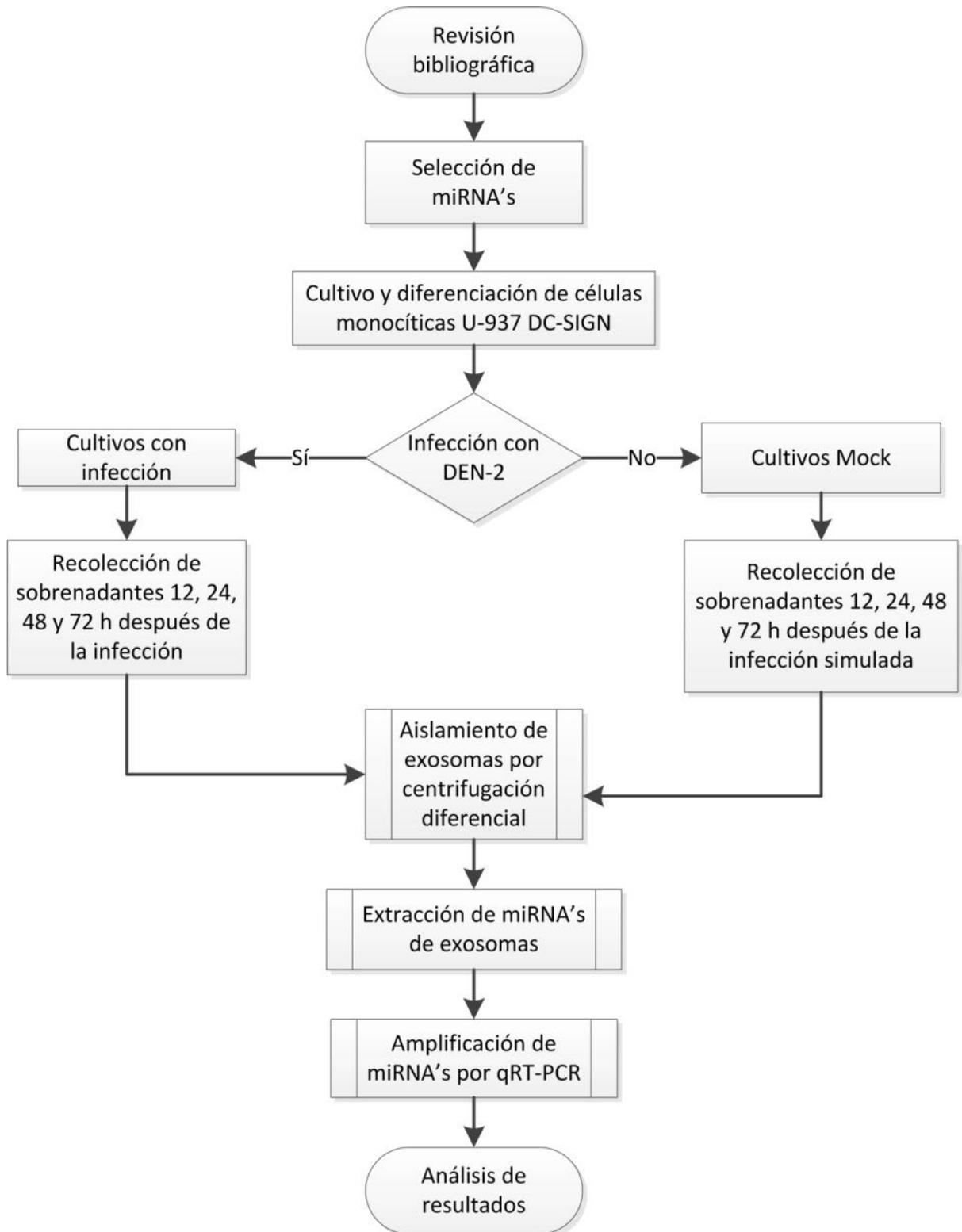
#### 5.4. Modelo de análisis estadístico

Se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 20, en el que primeramente se probó la bondad de ajuste de los datos de Ct registrados para los grupos evaluados (Células infectadas y control Mock), empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con simulación de Monte Carlo (confianza 95% y 10000 muestras).

Se realizaron las pruebas U de Mann-Whitney y t de Student, para comparar Rangos o medias, según correspondiera, y poder conocer si la diferencia de expresión con base en los Ct era significativa entre las células infectadas con DEN2 y las células tratadas con control Mock. Ambas pruebas, considerando que las muestras analizadas no están relacionadas entre sí, por tratarse de sistemas diferentes, uno bajo infección y otro sin ella.

Finalmente, para identificar si había una relación entre el tiempo y la diferencia de expresión de cada miRNA en las células infectadas respecto al Mock, asumiendo heterocedasticidad, se realizó la prueba H de Kruskal-Wallis con simulación de Monte Carlo (confianza 95% y 10000 muestras) y la prueba ANOVA de un factor asumiendo homocedasticidad, según correspondiera.

### 5.5. Diseño general del estudio



## VI. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1. Cultivo celular

Para las muestras de células infectadas, se diferenciaron  $10^6$  células monocíticas U937 DC-SIGN en multiplicadas de 12 pozos para cultivo celular Nuclon™ Delta Surface, con PMA 1:10,000 en 1.5 mL de medio de diferenciación en cada pozo, por 48 h. Se realizó la infección de 4 de los cultivos utilizando DEN2 con una MOI de 1 (considerando el 70% de supervivencia de células infectadas) y se realizó el control Mock con cerebro de ratón en otros 4 pozos.

La infección y el control Mock, se realizó colocando el virus diluido en medio de diferenciación, suficiente para obtener la MOI de 1 en 500  $\mu$ L. Se agitó por 15 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se adicionó 1.5 mL de medio de diferenciación y se agitó 2 minutos más. Finalmente se dejaron incubar a 37 °C en incubadora Panasonic.

El proceso se realizó para los 4 tiempos de infección a evaluar con sus respectivos Mock (12h, 24h, 48h y 72h), retirando el medio de los cultivos según correspondiera el tiempo.

### 6.2. Aislamiento de exosomas

Los exosomas liberados por las células, se extrajeron realizando una adaptación de los métodos reportados en la literatura y con base a las modificaciones reportadas,<sup>55,56</sup> en cuyos casos la eficiencia del método y la pureza del material aislado fue comprobada.

El proceso general fue una centrifugación diferencial, la cual consistió en someter el medio donde se cultivaron las células a una serie de centrifugaciones realizadas con

diferentes aceleraciones (RCF) y tiempos, en cada centrifugación se separaron del medio diferentes componentes por su tamaño y velocidad de sedimentación, las partículas más pequeñas (<200 nm) se separan por filtración y finalmente los exosomas se aislaron empleando el reactivo Total Exosome Isolation (from cell culture media) de Invitrogen™ (Cat. 4478359).<sup>55,56</sup>

En primer lugar, el volumen recolectado de medio de cada prueba (aproximadamente 8 mL) se dividió en tubos Eppendorf de 2.0 mL y se centrifugaron 2,000 Xg (RCF) a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5810R con un rotor F45-30-11, por 20 minutos; se tomó el sobrenadante y se transfirió a tubos Eppendorf de 2.0 mL. Las muestras se volvieron a centrifugar, esta vez por 40 minutos, a 4 °C y 12,200 Xg (RCF), en la misma centrífuga y con el mismo rotor que en primera ocasión. Se recolectó aproximadamente el 90% del sobrenadante, dejando el fondo del tubo con el centrifugado, que se descartó; el sobrenadante recolectado se filtró por presión en filtros TPP de 0.22 µm; finalmente las muestras filtradas se transfirieron a sendos tubos para ultracentrífuga.

El volumen de cada tubo se completó con PBS esterilizado y filtrado, para evitar que los tubos colapsaran durante el proceso de ultracentrifugación. Se sometieron las muestras a ultracentrifugación por 1 hora y 20 minutos, en una ultracentrífuga Optima™ L-100 XP con un rotor Beckman SM41Ti, a 4 °C y 120,000 Xg (RCF). Se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 1 mL de muestra en cada tubo.

A cada tubo se le adicionaron 500 µL del reactivo Total Exosome Isolation (from cell culture media) de Invitrogen™ y se dejaron incubando toda la noche en refrigeración (2-8 °C). Tras la incubación, las muestras se transfirieron a sendos tubos Eppendorf de

2.0 mL y se centrifugaron por 1 hora, a 4 °C y 10,000 Xg (RCF) en una centrifuga Eppendorf 5810R con un rotor F45-30-11.

Se decantó todo el sobrenadante y se dejaron los botones de exosomas de cada tubo, procurando dejarlos lo menos húmedo posible. Cada botón se resuspendió en 50 µL de PBS.

### 6.3. Extracción y cuantificación de RNA

Para poder estudiar el perfil de miRNA's expresados y liberados en exosomas se empleó un método de extracción basado en el procedimiento de TRIzol® reagent<sup>57</sup> y el uso de columnas de purificación (Cat. C1011-250)<sup>58</sup>, combinado con la metodología de enriquecimiento de miRNA's.<sup>59</sup> A cada alícuota de exosomas aislados y resuspendidos en PBS (aproximadamente 50 µL) se le adicionó 3 volúmenes de TRIzol® (Cat. 15596018), 150 µL, se mezcló en vórtex por 1 minuto y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se adicionó un tercio de volumen de etanol absoluto ( 67 µL) a cada muestra y se mezcló en vórtex por 1 minuto, se decantó el contenido de cada tubo en una columna de separación para cada muestra. Se colocó cada columna en un tubo de recolección diferente y se centrifugaron a 12,000 rpm en una centrifuga Eppendorf mini spin con un rotor F-45-12-11, por 15 segundos. Al filtrado se le adicionaron 133 µL de etanol absoluto (2/3 del volumen original de la muestra con TRIzol®), y se mezcló en vórtex, posteriormente se colocó en una nueva columna de filtrado con un nuevo tubo de recolección y de igual manera, se centrifugó a 12,000 rpm en una centrifuga Eppendorf mini spin con un rotor F-45-12-11, por 15 segundos.

El filtrado final se descartó y cada columna de separación se lavó 2 veces con 500 µL de Buffer de Lavado (WB), centrifugando a 12,000 rpm en una centrifuga Eppendorf

mini spin con un rotor F-45-12-11, por 30 segundos en cada lavado. Finalmente, para secar las muestras, se centrifugaron los filtros a 12,000 rpm en la misma centrifuga por 1 minuto. Ambos filtros se transfirieron a columnas de recolección nuevas y se eluyeron las muestras adicionando 30 µL de agua DEPC en cada filtro y centrifugando nuevamente a 12,000 rpm por 1 minuto. Ambos filtrados se juntaron en una sola muestra.

El contenido de RNA de las muestras se cuantificó en un Nano Drop empleando como blanco agua DEPC.

#### 6.4. Análisis de miRNA's y blancos moleculares

El análisis de secuencias y búsqueda de bases de datos para blancos moleculares de los miRNA's se realizó de acuerdo a la información disponible en <http://www.mirbase.org/><sup>60</sup>, que es una base de datos online que provee información relativa con los miRNA's según la especie donde se ha considerado la posibilidad de su presencia o identificado ya sea experimentalmente o por análisis computacional de genomas.<sup>61,62,63</sup> Así mismo reporta información sobre las secuencias de los miRNA's<sup>64</sup>, bases de datos con blancos moleculares posibles, criterios de nomenclatura<sup>65</sup>, entre otros aspectos que sirvieron para la investigación y recolección de información de miRNA's en el mundo.<sup>66,67</sup>

Los blancos se identificaron y seleccionaron de las bases de datos miRanda-mirSVR<sup>68,69</sup> y miRDB<sup>70,71</sup>, donde se exponen criterio de selección de mRNA blancos de los miRNA, más favorecidos, ventajas y desventajas;<sup>72,73</sup> y adicionalmente proporcionan información sobre los mRNA blanco más factibles de acuerdo a diferentes escalas que se emplean en los análisis de secuencias.<sup>74-76</sup>

Los algoritmos de las bases de datos miRanda-mirSVR y miRDB permitieron la selección de blancos moleculares de acuerdo a su confianza de unión al mRNA en el caso de miRDB<sup>77</sup>, y de inhibición de expresión de acuerdo a miRanda-mirSVR<sup>69,78</sup>.

## 6.5. qRT-PCR

### 6.5.1. Retrotranscripción

Con base a lo indicado en el manual del fabricante del kit para qRT-PCR TaqMan™ MicroRNA de Applied Biosystems (Cat. 4366597)<sup>79</sup>, se realizó la mezcla de reacción considerando las concentraciones de RNA presentes en cada muestra, a manera de que se colocara siempre la misma cantidad de RNA extraído de células infectadas y de Mock (40-80 ng, dependiendo la muestra), considerando un volumen de 4.575 µL de agua DEPC con muestra de RNA. Se empleó  $7.5 \times 10^{-6}$  mM de dNTP, Buffer de retrotranscripción a una concentración de 1X, 25 U de retrotranscriptasa y 2 unidades de inhibidor de RNAsas, por cada primer 5X de miRNA a evaluar, diluido a 1X, para un volumen final de 7.5 µL, para cada muestra 24, 48 y 72 h de infección y control Mock. Se corrió con un control negativo que contenía 4.575 µL de agua DEPC en lugar de muestra.

Se corrió la retrotranscripción en un Termociclador T100™ de BIO-RAD, con las siguientes condiciones:

**Tabla 1.** Condiciones de RT-PCR

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

### 6.5.2. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó con base a las mismas indicaciones para el kit para qRT-PCR TaqMan™ MicroRNA de Applied Biosystems (Cat. 4366597)<sup>79</sup>, considerando 5.0 µL de TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Cat. 4440040), 2.5 µL de agua DEPC, 2.0 µL de cDNA producto de RT-PCR y sonda 20X de miRNA a evaluar, diluida a 1X, para un volumen final de 10 µL por cada reacción. Cada sonda se evaluó por triplicado para cada muestra de cDNA, de acuerdo al miRNA analizado, y así mismo se corrió su control negativo que contenía el producto del control negativo de la RT-PCR, por triplicado y para cada sonda correspondiente, miR-146a-5p (Cat. 4427975, ID 468), Let-7e-5p (Cat. 4427975, ID 2406) y miR-29c-3p (Cat. 4427975, ID 587)

La prueba se corrió en un Termociclador en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, bajo las siguientes condiciones:

**Tabla 2.** Condiciones de PCR en tiempo real

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

Para comprobar la amplificación de los miRNA por qRT-PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3%, corriéndose a 100 V hasta mitad del gel, empleando como referencia el marcado de peso molecular marcador de Peso Molecular TrackIt™ 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogen (Cat. 10488-085) y el colorante para gel Pilot loading Dye 5X (Cat. 1037630).

## 6.6. Análisis de expresión diferencial

La diferencia de expresión de miRNA's se analizó como porcentaje, a través de la relación de Ct de cada muestra comparada con su respectivo Mock. Así mismo se desarrolló un modelo matemático que permitiera visualizar gráficamente el comportamiento o tendencia de los datos observados (figura 7). Partiendo del hecho de que la diferencia de expresión ( $dE$ ) se analizaría por la relación entre el valor de Ct reportados para el cultivo de prueba ( $Ct_I$ ) y el cultivo Mock ( $Ct_M$ ), para un miRNA dado, se estableció la ecuación:

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

Lo que expresa la cantidad de veces que los Ct del cultivo infectado, se encuentran respecto a los Ct del cultivo Mock. Sin embargo, por sí sola esta ecuación no permitía poder analizar la diferencia de expresión en términos de  $n$  veces por encima o por debajo de la expresión en el Mock, sino solo como decimales o enteros, considerando los supuestos de que:

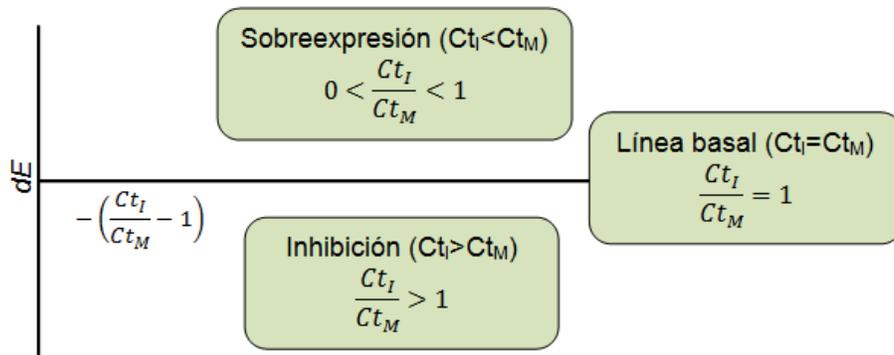
1.  $Ct \propto \frac{1}{[cDNA]}$ , puesto que entre mas cDNA haya al inicio de la reacción más rápido se superará la lectura de fondo y se identificará la fluorescencia propia de la amplificación
2.  $dE > 1$ , Indicaría inhibición de la expresión,  $Ct_I > Ct_M$
3.  $dE = 1$ , Indicaría expresión igual o no alterada,  $Ct_I = Ct_M$
4.  $0 < dE < 1$ , Indicaría sobreexpresión del miRNA,  $Ct_I < Ct_M$
5.  $dE = 0$ , Indicaría ausencia de expresión del miRNA en el cultivo infectado
6. Cuando  $Ct_M \rightarrow 0$ ,  $dE \rightarrow \infty$ , la lectura de la amplificación pudo no haberse realizado correctamente por errores sistemáticos

Por lo que partiendo del supuesto 3, se re arregló la fórmula propuesta, de la siguiente manera:

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

Lo que permitiría contrarrestar la presencia del valor 1 como expresión no alterada y a su vez ajustarlo como línea basal de comparación gráfica. Finalmente, partiendo del supuesto 1 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 quedó arreglada finalmente de la siguiente manera:

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



**Figura 7. Esquema gráfico de la función dE**

Se indican las regiones de la gráfica y su respectiva interpretación.

Esta ecuación fue la empleada para determinar la diferencia de expresión de los miRNA's y poderla graficar, con 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 se posee una curva de calibración.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Análisis y selección de miRNA's a evaluar

De acuerdo a un análisis minucioso de la literatura, se eligieron tres miRNA's cuya importancia durante la infección con dengue fuese relevante, para poder analizar su variabilidad en la expresión durante la infección, relacionarla con su liberación en exosomas y de acuerdo a las vías en que se cree que pueden intervenir por unión a mRNA específicos, para favorecer la propagación del virus y contribuir al desarrollo de la sintomatología de la fiebre por dengue, esto con base a que el conocimiento a mayor profundidad de las vías que se ven alteradas durante la infección, podría contribuir al desarrollo de estrategias antivirales o métodos paliativos innovadores y comprender el proceso infeccioso para otros virus que liberen los mismos miRNA's en exosomas.<sup>13,46</sup>

Los miRNA's seleccionados y los mRNA's posibles blanco de unión se enlistan el cuadro 3, estos blancos moleculares se seleccionaron de entre el listado de las bases de datos miRanda-mirSVR<sup>68</sup> y miRDB<sup>70</sup>, por su influencia en procesos inflamatorios e inmunes que pueden afectar los cuadros clínicos durante las infecciones o alterar el tropismo viral. Así como las posibles vías en las que los tres pudieran intervenir, para deducir la posible relación del cambio en su expresión y liberación en exosomas durante la infección por DEN.

**Cuadro 3.** miRNA's seleccionados, alteraciones reportadas y mRNA blancos a analizar

miRNA	Alteración	mRNA's posibles de unión <sup>68,70</sup>
<b>miR-146a-5p</b>	Los miRNA's de la familia 146a se han reportado como sobreexpresados durante los procesos de infección con DEN <sup>12</sup>	SRSF6
		BCORL1
		TRAF6
		IRAK1
<b>Let-7e-5p</b>	Se ha reportado su sobreexpresión en casos de infección con DEN <sup>50,52</sup>	IL6
		CCL3
<b>miR-29c-3p</b>	No se ha reportado una alteración del mismo en casos con DEN <sup>13</sup>	HDAC4
		BCORL1

En el cuadro 4 se muestran las secuencias y estructura de los miRNA's enlistados en el cuadro 3; su relación se indica en el cuadro 5, donde se señala su punto de unión en los respectivos mRNA blancos propuestos.

**Cuadro 4.** Estructura principal de horquilla y secuencia de miRNA maduro de miRNA's seleccionados<sup>60</sup>

miRNA	Estructura de horquilla	Secuencia madura
<b>miR-146a-5p</b>	<pre> c   -----u   u   uu   c   u   g   uc 5'  cgaug   guaucc cagcu gagaacugaauu ca ggguu ug a  g 3'  gcuac   uauagg gucga uucuugacuuaa gu uccag ac u       u   ugucuc   -   -c   a   c   -   ug                     </pre>	21- UGAGAACUGAAUUC CAUGGGUU - 42
<b>Let-7e-5p</b>	<pre> c   cu   g   u   ----gga   a 5'  cc ggg   gag uaggagguuguauagu ga   gg c   3'  gg ccg   uuc auccuccggcauauc a cu   cc a       a   cu   g   -   agaggaa   c                     </pre>	8- UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU -29
<b>miR-29c-3p</b>	<pre> a   -   ggc   ucc   ---   u 5'  ucucuua ca   ugaccgauuuc   ugguguu   cagag c  u 3'  gggggaugu gu   auuggcuaaag   accacga   guuuu g       a   a   ---   uuu   ucu   u                     </pre>	54- UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA -75





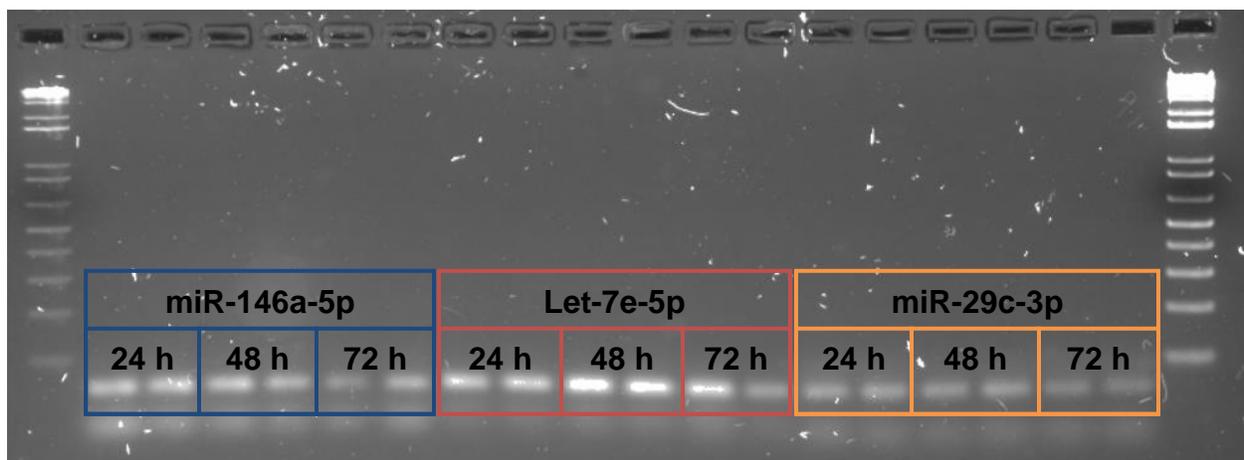
en la activación de endotelio vascular.<sup>81,82</sup> También, su intervención podría afectar el restablecimiento de la heterocromatina debido que podría unirse a mRNA codificantes de proteínas que participan en dicha función regulando desacetilación de histonas.<sup>80</sup>

### 7.1.3. miR-29c-3p

Se conoce su capacidad de inhibir moléculas antiapoptóticas, con lo que promueve la muerte celular, e inhibe la proliferación de células cancerígenas, por lo mismo, en casos de infecciones con algunos virus se puede aumentar la muerte celular, favoreciendo fagocitosis y cuadros inflamatorios que complican las infecciones, su presencia o alteración en casos de DEN podría ser fundamental en la diferenciación en casos de fiebre por dengue y dengue hemorrágico.<sup>12,54</sup> Adicionalmente, sus blancos moleculares inferidos sugieren su intervención en la expresión de proteínas que se cree participan en la modificación para regular la transcripción genética y desacetilación de histonas para inhibición de expresión génica.<sup>80</sup>

## 7.2. qRT-PCR

En la figura 8 se pueden observar las muestras amplificadas por PCR y corridas en gel de agarosa al 3%, lo que permitió corroborar que la amplificación los miRNA's sí se llevó a cabo y que la lectura reportada en el equipo de PCR en tiempo real solo se debía a la amplificación del cDNA propio de cada miRNA y no de la amplificación de alguna otra secuencia de DNA que pudiera estar presente en la muestra. Las muestras de 12 h no se reportan debido a que por la baja concentración de material amplificado, su apreciación era mínima en el gel corrido.



**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 3%**

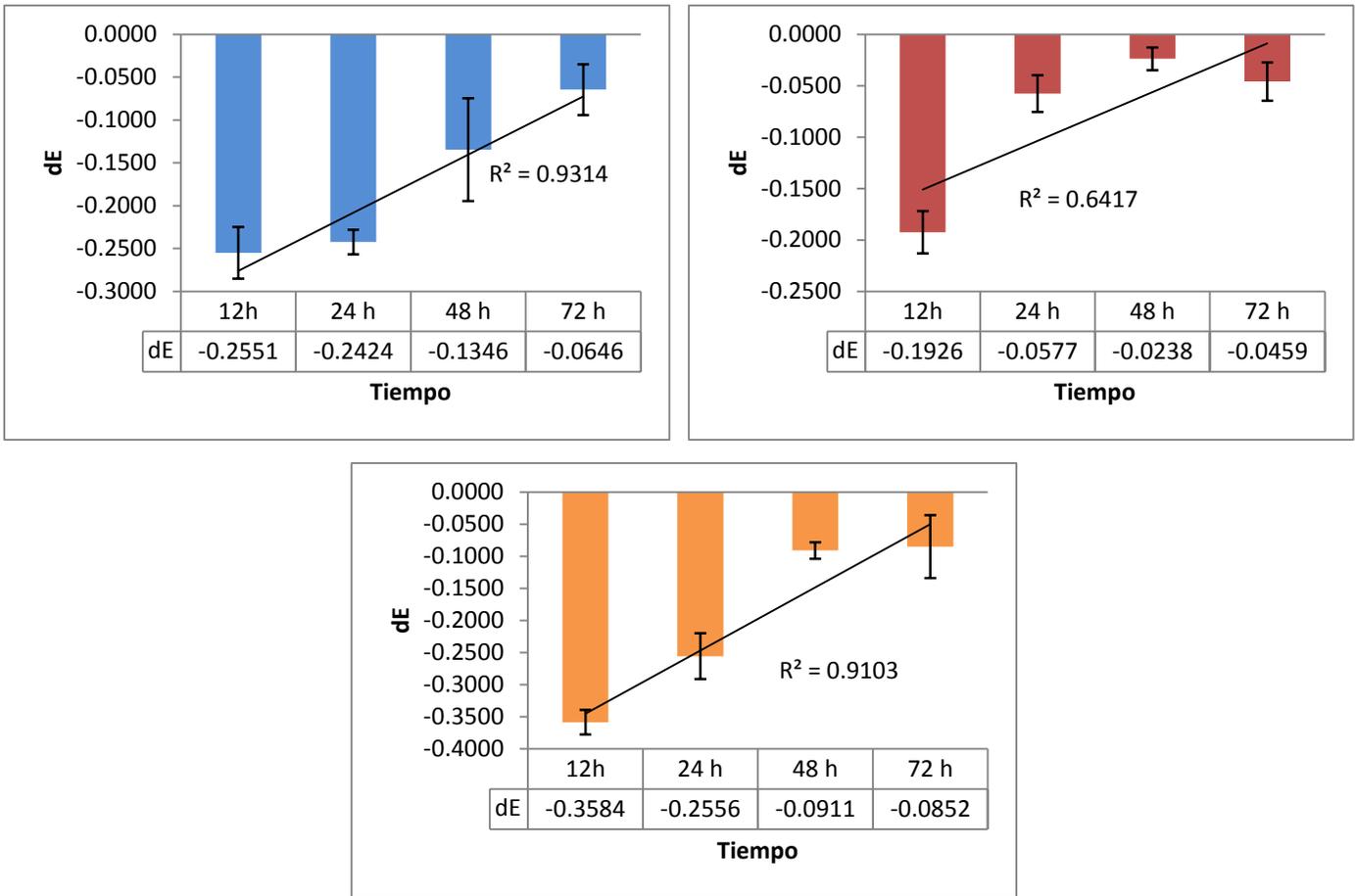
Las muestras se corrieron con marcador de peso molecular a cada extremo del gel y colocando adyacentes las muestras de infección con su respectivo Mock, por tiempo de izquierda a derecha (24 h, 48 h y 72 h), para cada miRNA.

Los valores de Ct observados para las muestras analizadas y sus repeticiones se encuentran reportados en la sección de anexos.

### 7.3. Expresión diferencial de miRNA's

La expresión diferencial de los miRNA's evaluada comparativamente por la relación de Ct determinados para el RNA extraído de los exosomas del cultivo infectado y el RNA de los exosomas del Mock, arrojó los resultados presentados en la figura 9, donde se puede observar que para los tres miRNA's analizados, la expresión comenzó a aumentar con el tiempo. Los valores calculados de diferencia de expresión para cada miRNA con el tiempo y respecto al Mock, con la fórmula

$dE = -\left(\frac{Ct_I}{Ct_M} - 1\right)$  se presentan en el apartado de anexos.

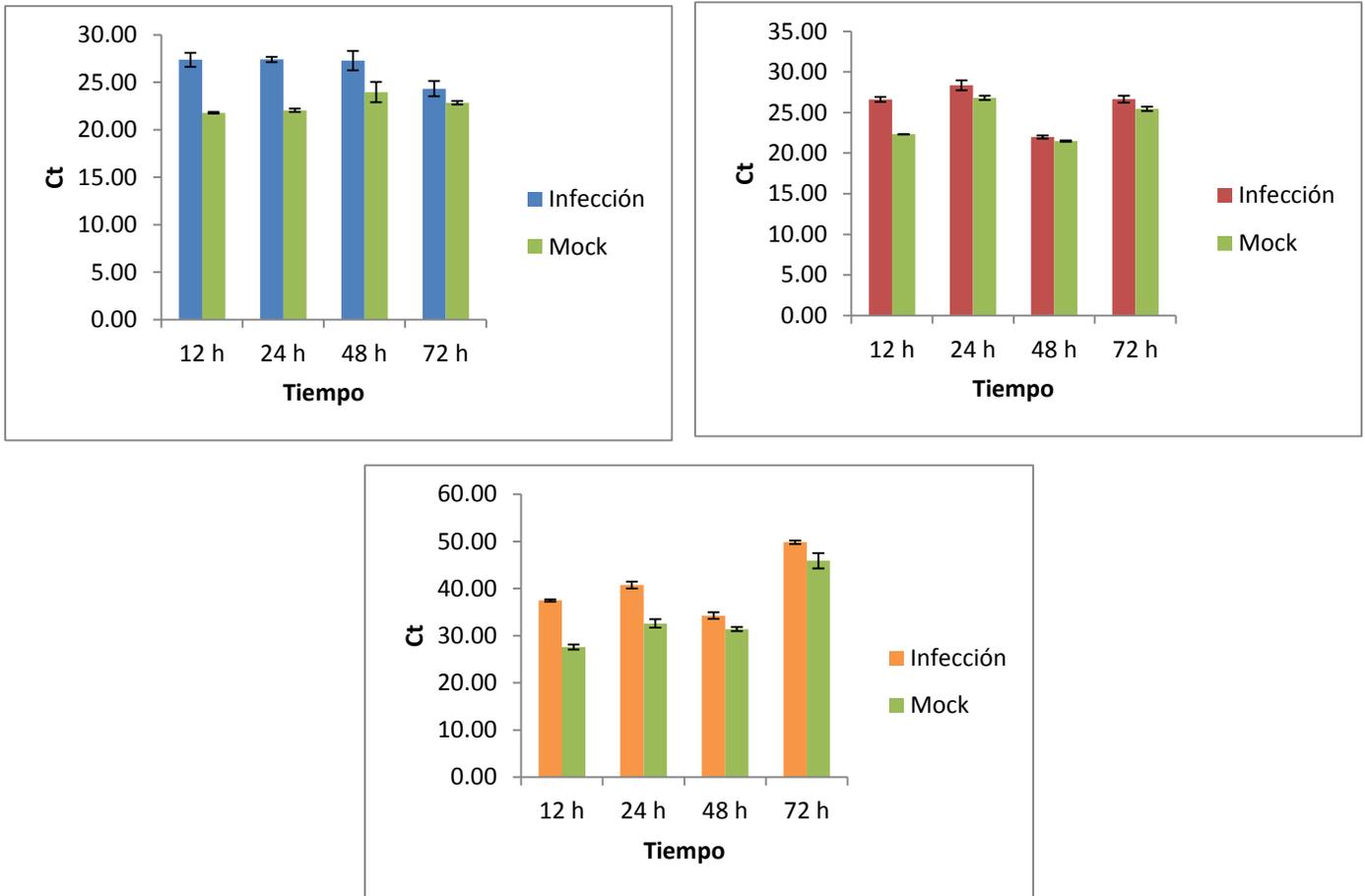


**Figura 9. Diferencia de expresión de miRNA's**

Diferencia de expresión con el tiempo, respecto al Mock, en los miRNA's miR-146a-5p (azul), Let-7e-5p (rojo) y miR-29c-3p (naranja).

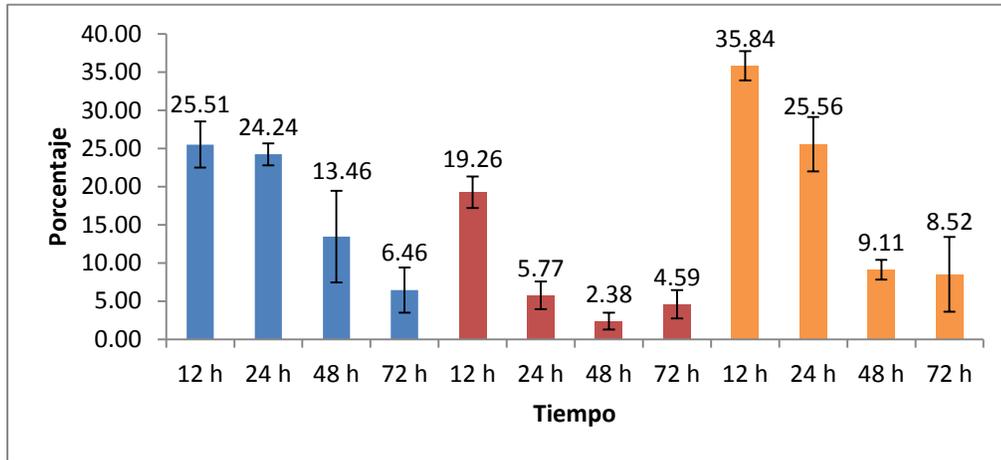
En la figura 10 se graficaron comparativamente los valores de Ct promedio para cada miRNA amplificado del RNA proveniente de los exosomas del cultivo infectado, contra su respectivo Mock. Adicionalmente, en la figura 11 se puede observar gráficamente el comportamiento porcentual de la diferencia de estos valores de Ct.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNA's PRESENTES EN EXOSOMAS DE CÉLULAS MONOCÍTICAS INFECTADAS POR DENGUE VIRUS



**Figura 10. Gráficos comparativos de Ct**

Se muestran los valores de Ct promedio, determinados por qRT-PCR en los miRNA's evaluados provenientes de exosomas de células infectadas, miR-146a-5p (barras azules), Let-7e-5p (barras rojas) y miR-29c-3p (barras naranja), contra sus respectivos Mock (barras verdes).



**Figura 11. Porcentaje de diferencia de expresión**

Los valores de diferencia de expresión en porcentaje, para los miRNA's evaluados miR-146a-5p (barras azules), Let-7e-5p (barras rojas) y miR-29c-3p (barras naranja), contra sus respectivos Mock (barras verdes), se muestran respecto al tiempo.

#### 7.4. Análisis estadístico de datos

Para la bondad de ajuste se buscó comparar si el comportamiento en cuanto a la distribución de los datos de Ct observados en el Mock y la Infección, obedecían una distribución normal o no, es decir  $H_0: F(Ct) = F_0(X)$  si  $p \geq 0.05$  y  $H_a: F(Ct) \neq F_0(X)$  si  $p < 0.05$ , para con ello decidir el tratamiento estadístico que se le daría a los mismos valores en la inferencia para demostrar si había una diferencia estadísticamente significativa entre los Ct observados en el cultivo de prueba con infección y el cultivo Mock. Para ello, los valores de Ct para los miRNA's miR-146a-5p y Let-7e-5p se trataron con la prueba U de Mann-Whitney, para comparar rangos con las hipótesis  $H_0: RC_{t_I} = RC_{t_M}$  si  $p \geq 0.05$  y  $H_a: RC_{t_I} \neq RC_{t_M}$  si  $p < 0.05$ ; y los valores de Ct para el miRNA miR-29c-3p se trataron con la prueba t de Student para muestras no relacionadas, para comparar medias con las hipótesis  $H_0: \bar{Ct}_I = \bar{Ct}_M$  si  $p \geq 0.05$  y  $H_a: \bar{Ct}_I \neq \bar{Ct}_M$  si  $p < 0.05$ . Los valores observados en estas pruebas se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de Ct

miRNA	Muestra	Bondad de ajuste <sup>1*</sup>	Diferencia significativa
<b>miR-146a-5p</b>	Infección	0.413	0.035 <sup>2*</sup>
	Mock	0.012	
<b>Let-7e-5p</b>	Infección	0.921	0.008 <sup>2*</sup>
	Mock	0.022	
<b>miR-29c-3p</b>	Infección	0.229	0.001 <sup>3*</sup>
	Mock	0.418	

1\* Prueba de Kolmogorov-Smirnov; 2\* U de Mann-Whitney; 3\* t de Student para muestras no relacionadas.

Los valores de dE calculados se analizaron de la misma forma, primeramente, determinando su bondad de ajuste con el mismo planteamiento que el usado para los Ct, comparando si  $H_0: F(dE)=F_0(X)$  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 las hipótesis  $H_0: S_{dE12h}=S_{dE24h}=S_{dE48h}=S_{dE72h}$  si  $p \geq 0.05$  y  $H_a: S_{dE12h} \neq S_{dE24h} \neq S_{dE48h} \neq S_{dE72h}$  si  $p < 0.05$ .

El análisis de relación t-dE, se realizó con base a los resultados de homocedasticidad, realizándose una ANOVA de 1 factor para los valores de dE calculados en los casos de los miRNA's miR-146a-5p y Let-7e-5p, con las hipótesis  $H_0$ : Las medias 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 las medias de valores de dE a diferente tiempo si  $p < 0.05$ ; y los valores de dE calculados para el miRNA miR-29c-3p se trataron con la prueba de Kruskal-Wallis, para determinar  $H_0$ : 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 valores observados en estas pruebas se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de dE

miRNA	Bondad de ajuste <sup>1*</sup>	ANOVA	Relación t-dE
<b>miR-146a-5p</b>	0.089	0.454	0.007 <sup>2*</sup>
<b>Let-7e-5p</b>	0.094	0.668	0.002 <sup>2*</sup>
<b>miR-29c-3p</b>	0.569	0.001	0.001 <sup>3*</sup>

1\* Prueba de Kolmogorov-Smirnov; 2\* ANOVA de 1 factor; 3\* Prueba de Kruskal-Wallis.

La congruencia de los datos anteriores se verificó realizando los mismos análisis para los valores de Ct observados de forma individual, obteniéndose los resultados reportados en la tabla 5.

**Tabla 5.** Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de Ct

miRNA	Muestra	ANOVA	Relación t-dE
<b>miR-146a-5p</b>	Infección	0.001	0.001 <sup>2*</sup>
	Mock	0.001	0.001 <sup>2*</sup>
<b>Let-7e-5p</b>	Infección	0.072	0.001 <sup>1*</sup>
	Mock	0.001	0.001 <sup>2*</sup>
<b>miR-29c-3p</b>	Infección	0.001	0.001 <sup>2*</sup>
	Mock	0.001	0.001 <sup>2*</sup>

1\* ANOVA de 1 factor; 3\* Prueba de Kruskal-Wallis.

**Tabla 6.** Resultado de valores p para el análisis estadístico de datos de Ct por tiempo

miRNA	Tiempo	Muestra	Bondad de ajuste <sup>1*</sup>	Diferencia significativa <sup>2*</sup>
<b>miR-146a-5p</b>	12 h	Infección	0.551	0.001
		Mock	0.605	
	24 h	Infección	0.206	0.001
		Mock	0.981	
	48 h	Infección	0.277	0.719
		Mock	0.932	
	72 h	Infección	0.946	0.607
		Mock	0.747	
<b>Let-7e-5p</b>	12 h	Infección	0.356	0.001
		Mock	0.864	
	24 h	Infección	0.702	0.018
		Mock	0.632	
	48 h	Infección	0.703	0.160
		Mock	0.642	
	72 h	Infección	0.660	0.009
		Mock	0.302	
<b>miR-29c-3p</b>	12 h	Infección	0.933	0.001
		Mock	0.410	
	24 h	Infección	0.575	0.012
		Mock	0.168	
	48 h	Infección	0.654	0.313
		Mock	0.936	
	72 h	Infección	0.970	0.006
		Mock	0.611	

1\* Prueba de Kolmogorov-Smirnov; t de Student para muestras no relacionadas.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1. Diferencia de expresión en los miRNA's

Los valores de Ct observados para los miRNA's, son significativamente diferentes entre las células infectadas y el Mock, para el miR-146a-5p con  $p=0.035$ , Let-7e-5p  $p=0.008$  y miR-29c-3p  $p=0.001$ . Mostrándose la mayor diferencia de Ct a las 12h y 24 h para los 3 miRNA's, donde los valores de p calculados para las pruebas de T tienden a 0; aunque los 3 miRNA's mostraron no tener diferencia significativa en Ct a las 48 h ( $p>0.05$  para prueba t de Student, para los 3 miRNA's), lo que puede implicar que a partir de ese momento la expresión de estos comienza a ser semejante tanto en las células infectadas como en el Mock, siendo las diferencias observadas gráficamente causa del azar y por cuestión de la muestra misma.

A partir de las 72 h de prueba, el único miRNA que no presentó una diferencia significativa en sus valores de Ct respecto al Mock, fue el miR-146a-5p ( $p=0.607$ ), lo que puede estar relacionado con lo mencionado anteriormente respecto al restablecimiento de expresión del mismo; sin embargo, a las 72 h se observó una diferencia significativa en los valores de Ct para los miRNA's Let-7e-5p ( $p=0.009$ ) y miR-29c-3p ( $p=0.006$ ), aunque se debe considerar que la diferencia significativa de expresión en cada uno de estos miRNA's puede deberse a la propia respuesta celular ante diferentes estados fisiológicos, necesidades, respuesta a estímulos, variaciones con el tiempo, etc. y que ocasionan que los requerimientos de expresión varíen de forma distinta en las células infectadas y no infectadas al mismo tiempo, pues la expresión es un evento dinámico y variado para cada gen.

## 8.2. Relación del cambio de expresión de los miRNA's con el tiempo

El análisis estadístico para la relación de variables muestra que la diferencia de expresión de cada miRNA sí es un evento dependiente del tiempo, por lo que el progreso en las infecciones es un factor clave para la liberación de moléculas en exosomas, como los miRNA's analizados. En este supuesto, cabe resaltar que para los miRNA's miR-146a-5p y Let-7e-5p, el comportamiento de valores de Ct sigue una tendencia  $F_0$  (normal) para las células infectadas, y no para los Mock, lo que puede deberse al propio evento infeccioso, que puede estar induciendo la variación en la expresión de los miRNA's al inicio (12-24h), para después restablecerse (a partir de las 48 h), adquiriendo el comportamiento acampanado de una curva normal en cuanto a la expresión de los miRNA's.

Todos los miRNA's presentaron un aumento en la expresión partiendo de un punto de expresión inferior en células infectadas respecto al Mock, lo que puede indicar que antes de las 12 h de infección los eventos ocurridos en respuesta al primer contacto con el virus, son cruciales en el proceso de expresión de dichos miRNA's, para analizar esto sería necesario evaluar la expresión genética a un tiempo cercano a 0 h de infección y al menos dos puntos más de referencia como 3 h y 6 h posteriores a la infección. Así mismo se debe considerar la posibilidad de que la MOI empleada para la infección fuese un factor que impidiera no observar una sobreexpresión como tal en los miRNA's sino solo un aumento de expresión hasta acercarse a la similitud con el Mock, pues en trabajos previos con MOI mayores se llegó a observar una tendencia desde la inhibición a las 24 h, que llega a sobreexpresión en algunos casos, a las 72 h.

### 8.3. Análisis de posibles mRNA blancos de los miRNA's y sus implicaciones

El perfil de expresión observado en el caso del miR-146a-5p, coincide con el reportado en la literatura para los miRNA's pertenecientes a esta familia<sup>12</sup>, en que su expresión aumenta en células mononucleares aisladas de pacientes infectados con dengue.<sup>51</sup> Este aumento de expresión es compatible con el perfil patogénico del virus, en que se ha reportado su capacidad de inhibir la síntesis de INF- $\beta$  e INF- $\lambda$ , cuyo efecto antiviral es fundamental para la respuesta inmune en los seres humanos;<sup>9,12,83</sup> si la expresión de dichas citocinas se ve afectada, la infección viral puede avanzar con mayor facilidad.

Por el análisis de bases de datos para la complementariedad de este miRNA con mRNA, se cree que podría estar uniéndose a la región UTR 3' de TRAF6 e IRAK, que codifican para el factor asociado al receptor de TNF y la quinasa asociada al receptor de IL-1, respectivamente, y que intervienen en la vía de transducción para la expresión del NF- $\kappa$ B<sup>84</sup>, que es un complejo proteico encargado de regular la transcripción de interleucinas como IL-6 e IL-12, entre otras y que también se ha comprobado que influye en la regulación de expresión de INF- $\beta$ <sup>85</sup>.

Adicionalmente, otro blanco molecular del miR-146a-5p y que es común con el miRNA Let-7e-5p, es el mRNA del gen de IL-6,<sup>80</sup> que es encargado de la expresión de esta misma citocina. Por lo que se puede decir que la inhibición de la expresión de esta proteína podría verse reducida por acción sinérgica de estos dos miRNA's en el mismo gen IL6 y en los codificantes para sus factores de transcripción (TRAF6 e IRAK1).

Lo anterior es compatible con el perfil de expresión de Let-7e-5p, que pese a partir de la inhibición al principio de la infección, igual que el miR-146a-5p, comienza a

augmentar en expresión con el tiempo. Sin embargo, también es importante considerar que no se sabe con certeza quién regula a cada miRNA, es decir, si el DEN2 es responsable de la inducción de expresión de ambos miRNA's o es la célula y cómo se afecta esto en las primeras 12 h de la infección, pues la célula infectada puede estar dejando de expresar estos miRNA's en respuesta a la presencia viral y como factor de inducción de respuesta inmune, pero el virus podría de alguna manera estar contrarrestando este efecto inhibitorio para reducir la respuesta de la célula, propiciando la expresión de dichos miRNA's.

Así mismo puede que al pasar el tiempo y comenzar a restablecerse el estado fisiológico normal de la célula, esta misma podría estar propiciando la expresión de cualquiera de los dos miRNA's nuevamente, para restablecer su estado basal en cuanto a la expresión las citocinas y otras moléculas con las que se encuentren relacionados, lo que podría explicar por qué se parte de una expresión menor al principio de la infección (12 h) y se tiende a restablecer este parámetro. Este comportamiento de expresión del miR-14a-5p y el miRNA Let-7e-5p, es compatible con lo reportado a nivel celular, en que su expresión se altera de forma ascendente en casos de infecciones con DEN y procesos inflamatorios.<sup>12,52</sup>

Para considerar la importancia de lo que implica la inhibición de la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B por parte del miR-146a, y por qué la célula podría estar dejando de expresarlo por sí misma al principio de la infección y por qué el propio DEN podría estar induciendo su expresión con la finalidad de poderse diseminar a otras células (como sería un comportamiento *in vivo*), se debe tener presente la función de los principales productos proteicos cuya expresión regula: IL-6, IL-12 e INF $\beta$ .

La IL-6 es una citocina principalmente secretada por linfocitos TH2, monocitos, macrófagos y células dendríticas, que interviene en la activación de linfocitos B, principalmente para la producción de IgG; participa de forma sinérgica con la IL-3 para la estimulación de células progenitoras mieloides y producción de plaquetas;<sup>86</sup> contribuye al reclutamiento de linfocitos T y actúa a nivel hepático para estimular la producción de proteínas de fase aguda (como la proteína C reactiva, el amiloide A sérico, la ceruloplasmina, la alfa1-glicoproteína ácida y el fibrinógeno), cuya función es regular la fase inflamatoria de los procesos infecciosos, modular la coagulación y dirigir la reparación tisular<sup>61,62,64</sup>. Estimula la producción de IL-2 por parte de linfocitos T, importante para el reclutamiento de un mayor número de linfocitos en las áreas de infección y activación de linfocitos Tc y macrófagos.<sup>82</sup>

La IL-12, es una citocina secretada principalmente por monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, cuyas funciones primordiales son colaborar en la diferenciación o activación de linfocitos TH1, para la producción de INF $\gamma$ , activa células NK y linfocitos Tc.<sup>81,82</sup>

Los INF- $\beta$  y  $\lambda$ , son conocidos principalmente por su actividad antiviral y estimulación de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que permite llevar a cabo la presentación antigénica y estimular la respuesta inmune de los organismos en defensa contra las infecciones; a su vez activan macrófagos e inducen expresión de VCAM e ICAM para la movilización celular.<sup>81,83,87</sup>

Así se podría explicar cómo el aumento en la expresión de miRNA's de la familia 146a, como es el caso del miR-146a-5p, podrían favorecer la replicación viral del dengue,<sup>12</sup> debido a una disminución de las citocinas que promueven la respuesta

inmune e inhiben la replicación viral, limitando la propagación de la infección. Así mismo el desarrollo de estrategias como miRNA's antagonistas de esta familia, podrían permitir el desarrollo de tratamientos contra la infección por dengue o el estudio a mayor profundidad de su patogenia.

Por otro lado, el miR-146a-5p también se cree involucrado en la inhibición de expresión del mRNA del Factor de Splicing 6 rico en serina y arginina, que es una proteína importante para el splicing alternativo, perteneciente a un grupo de proteínas ricas en serina (SRp).<sup>80</sup> Su importancia radica en el hecho de que dicha familia de proteínas a la que pertenece se ha relacionado con el cambio de isoforma (por splicing alternativo) de CD45 durante el proceso de activación de linfocitos T,<sup>88</sup> por lo que su inhibición podría alterar la respuesta inmune efectuada por estas células y reconocimiento intercelular, pues se ha observado que CD45 regula la unión de CD3 con el receptor de la célula T (TCR)<sup>89,90</sup> e induce agregación de células T y monocitos.<sup>91,92</sup>

Respecto al miRNA Let-7e-5p, cuya expresión disminuye en las primeras horas de infección y después comienza a aumentar, acercándose a la igualdad que en el Mock, se ha observado que los miRNA's de la familia Let-7e también interfieren con la traducción de genes como la citocina ligando 3 con motivo de cisteínas (CCL3), también conocida como proteína alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1),<sup>80</sup> que participa de manera importante en la respuesta inflamatoria durante procesos infecciosos, por su unión principalmente a receptores (CCR1 o CD191, CCR4 o CD194 y CCR5 o CD195) presentes en células polimorfonucleares, induciendo el reclutamiento de células efectoras como linfocitos, lo que afecta a la defensa celular contra agentes patógenos como virus y bacterias principalmente.<sup>93</sup>

También se ha observado que la presencia de MIP-I en procesos infecciosos con virus como influenza, pueden derivar en una respuesta inflamatoria exacerbada, mostrando con ello una fase sintomática más grave,<sup>94</sup> por lo que tanto los perfiles de expresión del Let-7e como el miR-146a-5p, se podrían esperar menores en pacientes con dengue hemorrágico que en pacientes con fiebre por dengue, debido los efectos que se pueden observar derivados de la liberación excesiva de IL-6, IL-12 y CCL3.

Sobre el miR-29c-3p del cual hasta el momento no se ha reportado información que lo relacione con DEN pero cuya expresión es constante en exosomas, se esperaba no encontrar variación en su perfil comparado en ambos cultivos de prueba, a manera de control, sin embargo, se observó que el comportamiento de su perfil de expresión fue inicialmente inhibido respecto al Mock pero en aumento con el tiempo.

Puede que esta alteración en la expresión del miR-29c-3p esté involucrada directamente con la infección viral, pues este miRNA se ha relacionado con casos de inflamación severa en pacientes con infección crónica de hepatitis C y fibrosis, habiendo una coincidencia entre el aumento de expresión de este miRNA y el desarrollo de fibrosis<sup>95</sup> y se debe considerar que en casos de complicaciones de infecciones con DEN, se ha reportado la infección de hepatocitos derivando con daño hepático.<sup>96,97</sup>

Dentro de los mRNA blanco que se han asociado a este miRNA, se encuentra el correspondiente a HDAC4, que participa en la desacetilación de histonas, inhibiendo la expresión genética, bloqueando el acceso a los promotores e interacciona con HDAC3 formando un complejo multiproteico; HDAC4 interviene principalmente el control de expresión de genes necesarios para la diferenciación y desarrollo celular.<sup>80</sup>

Considerando que la hiperacetilación de histonas en casos de infección por DEN se ha relacionado íntimamente con la exacerbación de la respuesta inmune, que empeora los síntomas durante la enfermedad debido a la inducción de expresión de IL-8 y otras citocinas influenciadas por el NF $\kappa$ B,<sup>98</sup> podría relacionarse la presencia de miR-29c-3p con un aumento de IL-6, IL-8 e IL-12, derivando en complicaciones clínicas como en los casos de dengue hemorrágico. Esto se podría comprobar con la medición de niveles de dichas citocinas durante la infección con DEN, comparándolo con células no infectadas y células infectadas tratadas con inhibidores de HDAC4 y/o un antagonista de miR-29c.

Se sabe que esta IL-8 puede llegar a ser secretada hasta el doble de lo normal, por células infectadas con DEN,<sup>98,99</sup> y dentro de sus funciones se encuentra actuar como quimiotáctico de linfocitos, eosinófilos y neutrófilos,<sup>81,82</sup> la inducción de la liberación de moléculas de adhesión como metaloproteínas (elastasa, gelatinasa B,  $\beta$ -glucuronidasa), la diapédesis de macrófagos, entre otras.<sup>100</sup> Un aumento en la producción de IL-8 puede llevar a la amplificación de la respuesta inmune, por el reclutamiento de células polimorfonucleares en sitios de infección, desencadenando la serie de eventos propios de su interacción con patógenos, como inducción de proteínas de fase aguda, liberación de citocinas proinflamatorias y ROS, entre otros factores que pueden llevar a complicaciones clínicas en casos infecciosos.<sup>81</sup>

En particular el aumento en la expresión de este miRNA, se podría relacionar con una respuesta de la propia célula para contrarrestar la inhibición causada por el resto de miRNA's interferentes en la producción de las IL mencionadas, mediante la inhibición de HDAC4, aunque esta a su vez podría intervenir inhibiendo la expresión de genes

relacionados con la respuesta inmune como  $\text{NF}\kappa\beta$ . El efecto final propio del miR-29c-3p en la expresión de interleucinas debe analizarse experimentalmente para poder dilucidar de forma clara su blanco molecular y lo que podría derivarse de su inhibición.

Por otro lado, se debe recordar que hay evidencia de que con la traslocación de la proteína de la cápside del DEN y se ha comprobado que puede actuar de forma similar a una histona, uniéndose a las mismas para formar heterodímeros e inhibir la formación del nucleosoma, dejando el material genético laxo y accesible para la transcripción genética<sup>101</sup>. Así se puede decir que el DEN es un virus que busca mantener activa la expresión genética de múltiples proteínas celulares, aunque aún no es claro cuáles proteínas son inducidas a su expresión ni por qué ocurre esto, puede entonces que el efecto del miR-29c-3p vaya más allá de la intervención en expresión de interleucinas, si es que su expresión es debida a algún tipo de intervención por el DEN.

El miR-29c-3p, también tiene un posible blanco molecular común con el miR-146a-5p, el mRNA de la proteína BCORL1, que es un correpresor transcripcional (proteína que reduce la expresión génica mediante su unión a un factor de transcripción), con acción en las regiones promotoras en conjunto con proteínas de unión a DNA. Su principal importancia es su capacidad de interacción con las desacetilasas de histonas para reprimir la transcripción genética. BCORL1 interactúa con BCL6 para la regulación de la expresión de genes de respuesta a IL-4, como los STAT, a través de la desacetilación.<sup>80</sup>

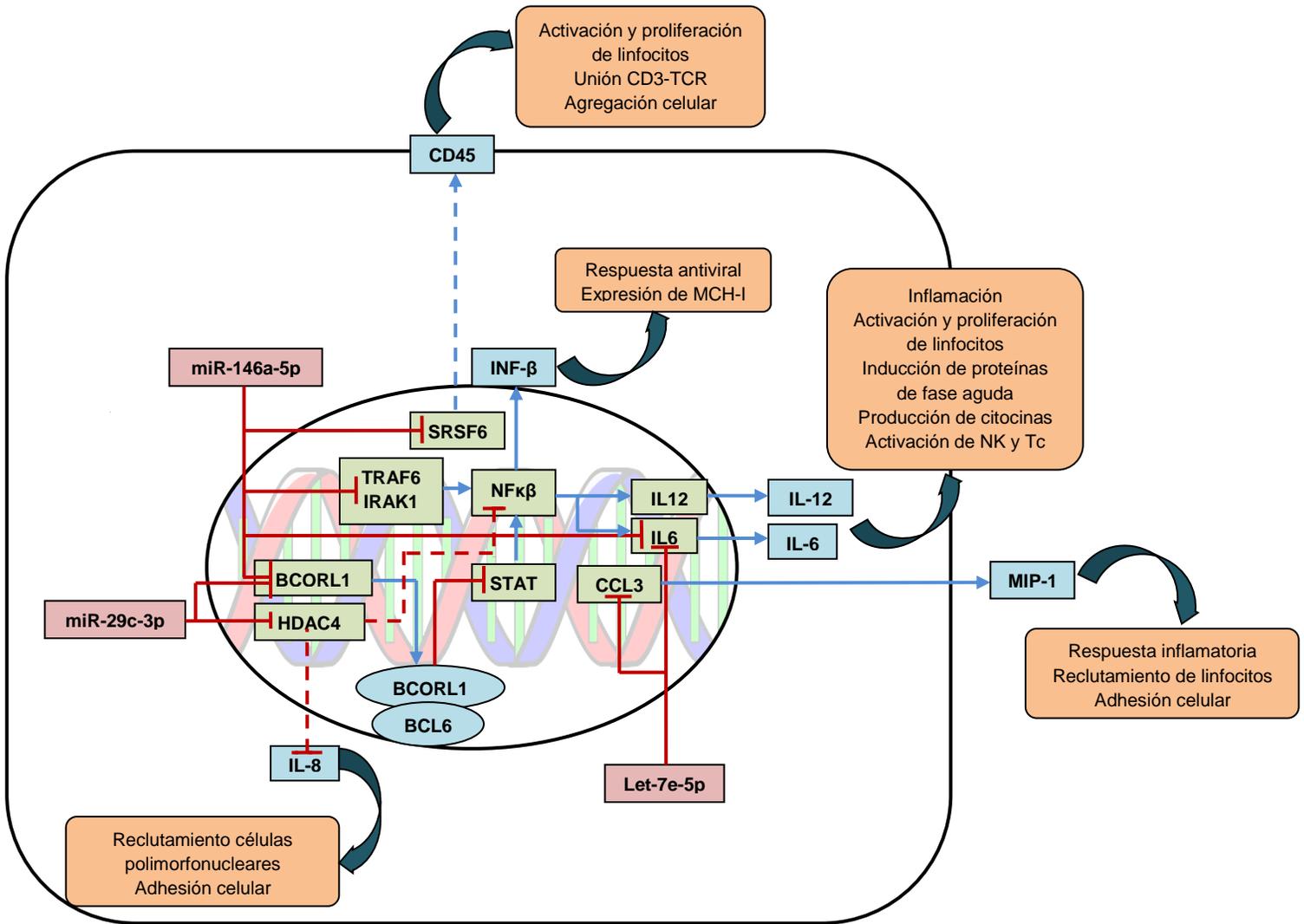
Las proteínas STAT actúan de múltiples maneras al inducir o inhibir la transcripción genética de diversas proteínas, aunque también se ha identificado su influencia en las vías transduccionales para la síntesis de proteínas relacionadas con la

respuesta inmune,<sup>102,103</sup> entre ellas la expresión de interleucinas como la IL-6 e IL-12, produciéndose reduciendo la fase inflamatoria de las infecciones cuando se encuentra inhibida,<sup>81</sup> debido a su intervención favoreciendo la traducción de genes como NFκβ.

104,105

La sobreexpresión de STAT debido a la inhibición de la expresión de BCORL1, podría estar relacionada con la inhibición de NFκβ causada por el miR-146a-5p, para contrarrestar la falta de síntesis de las interleucinas inducidas por este gen. Con esto podría esperarse que el patrón de expresión del miR-146a-5p y miR-29c-3p, en pacientes con fiebre por dengue fuera similar, por la falta de respuesta inmune exacerbada, mientras que en pacientes con dengue hemorrágico se podría esperar ver su patrón de expresión disminuido para miR-146a-5p y normal o aumentado para miR-29c-3p.

En la figura 12, se muestra un esquema general de las vías de interacción propuestas y en que se podrían ver implicados los miRNA's miR-146a-5p, Let-7e-5p y miR-29c-3p, haciendo énfasis en los efectos producidos por los productos proteicos finales de estas interacciones.



**Figura 12. Interacciones de miRNA's y su afección en productos proteicos finales**  
 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; miR-29c-3p, podría interactuar con HDAC4, lo que probablemente podría favorecer la expresión de IL-6, IL8 e IL-12; Let-7e-5p, podría intervenir en la traducción de CCL3, reduciendo la liberación de esta proteína; miR-146a-5p y miR-29c-3p, tienen en común la posible interacción con BCORL1, que podría desencadenar la liberación de INF-β, IL-6 e IL-12; finalmente, miR/146a/5p y Let-7e/5p, podrían afectar sinérgicamente la producción de IL-6, por unión al mRNA propio IL6.

Pese a las diversas interacciones posibles de los miRNA's con sus blancos moleculares deducidas computacionalmente y que pueden parecer de acción sinérgica o con el mismo objetivo, los blancos moleculares propuestos de esta forma, también pueden hacer que parezca paradójica la presencia de ambos miRNA's simultáneamente, por el efecto que podrían tener al interactuar con otros posibles mRNA, como el miR-146a y miR-29c, en que los miRNA's de la familia miR-29c podrían intervenir en la traducción de HDAC4 favoreciendo la expresión de INF- $\beta$ , IL-6 e IL-12, contrario a lo que se esperaría por acción de miR-146a sobre TRAF6 e IRAK1. Inclusive puede ser contradictorio el efecto con los propios blancos del mismo miRNA como es el caso de los de la familia miR-146a sobre BCORL1 y TRAF6/IRAK1, cuyo efecto final podría ser contrario, llevando por un lado a la inhibición de INF- $\beta$ , IL-6 e IL-12 y por otro a su expresión, respectivamente.

Por lo anterior es importante resaltar que se deben realizar comprobaciones experimentales sobre la inhibición o inducción de productos proteicos por presencia de miRNA's específicos. Esto permitiría comprender mejor la patogenia viral y su evolución con el tiempo, para poder idear estrategias de intervención o diagnóstico que permitan reducir el riesgo de presentar complicaciones clínicas como el dengue hemorrágico.

## IX. CONCLUSIONES

Se identificó un perfil de expresión diferencial en los miRNA's miR-146a-5p, Let-7e-5p y miR-29c-3p, que mostraron un aumento en su expresión, partiendo de un punto de inhibición respecto al Mock, que podría deberse a la respuesta celular contra el virus, durante las primeras 12 h de la infección y que mostró ser significativamente diferente entre el cultivo de prueba y el Mock. Así mismo se demostró estadísticamente que la liberación de los miRNA's en exosomas es una variable dependiente del tiempo de infección.

Con base al análisis de posibles mRNA blanco de los miRNA's analizados, se hizo una relación con su perfil de expresión, encontrándose una posible relación entre la presencia de estos miRNA's y la disminución de la respuesta inmune contra DEN. Aun así, se debe considerar que hay más miRNA's que pueden estar siendo liberados en exosomas e intervenir de diversas maneras en los procesos celulares al mismo tiempo, cuyo perfil es importante conocer, debido a que los exosomas y su contenido afectarían por igual a células infectadas y no infectadas, favoreciendo o limitando el proceso infeccioso con DEN, según el efecto conjunto de los miRNA's.

El estudio experimental de los miRNA's y de los exosomas en que viajan es importante debido a los efectos que podrían tener éstos, ya sea de forma individual o en conjunto, originando interacciones sinérgicas o inhibitorias entre ellos.

## X. PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas de funcionalidad en células sanas, con exosomas recolectados de sobrenadantes de células infectadas, para determinar si hay cambio de susceptibilidad a la infección viral en las mismas.
- Evaluar la expresión de los productos proteicos finales relacionados directa o indirectamente con mRNA's que podrían ser blanco de los miRNA's Let-7e-5p, miR-146a-5p y miR-29c-3p, o sus familias.
- Comparar los efectos de los miRNA's individuales contra los efectos causados por miRNA's totales presentes en exosomas, sobre la expresión de productos funcionales.
- Identificar si existe inhibición sinérgica por acción de los miRNA's con blancos moleculares comunes: familias miR-146a con Let-7e, sobre el mRNA de IL6; y miR-146a con miR-29c sobre el mRNA de BCORL1.
- Expandir el conocimiento sobre el perfil de expresión y liberación de miRNA's en exosomas de células infectadas con dengue, a través de la realización de microarreglos o secuenciación de última generación.
- Comprobar en qué otros miRNA's transportados por exosoma, se presenta una expresión diferencial.
- Analizar posibles polimorfismos o mutaciones que puedan presentar pacientes con fiebre por dengue y dengue hemorrágico, y relacionarlos con el efecto de los miRNA's Let-7e, miR-146a-5p y miR-29c y sus niveles en exosomas presentes en sangre.

## XI. REFERENCIAS

- 1) Del Ángel R. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. CINVESTAV; 2006: 38-43.
- 2) Uribarren Berrueta T. Dengue y Fiebre Chinkungunya [Artículo en internet] México: UNAM. Última revisión 10 de junio de 2015 [visitado el 19 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>
- 3) Dengue y dengue grave. Nota descriptiva N° 117. OMS; Mayo 2015.
- 4) Scitable [Internet]: USA: Natureeducation. Dengue Viruses; 2014 [visitado el 19 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>
- 5) First Dengue Vaccine Approved in More than 10 Countries. Sanofi Pasteur Press. 2016.
- 6) Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, HJ Muhammad Ismail HI, et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *New Eng J Med.* 2015; 373 (13). 1195-1206.
- 7) Singh Chahar H, Bao X, Casola A. Exosomes and their role in the life cycle and pathogenesis of RNA viruses. *Viruses;* 2015; 7: 3204-3225.
- 8) Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *TRENDS Mic.* 2004; 12 (7). 310-316.
- 9) Tambyah P, Chai S, Sepramaniam S, et al. microRNA expression in blood of dengue patients. USA: *AnnClinBio;* 2015.

- 10) Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Lainé S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO J.* 2005; 6 (10): 961-967.
- 11) Suresh M, Hong J, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intracellular communication. *Jor Prot*; 2010; 73: 1907-1920.
- 12) Wu S, He L, Li Y, Wang LF, Jiang L, Zhang P, et al. miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6. *J Infect*; 2013; 67: 329-341.
- 13) ExoCarta browser [Compilación en internet] Australia: La Trobe University. miRNA. [visitado el 21 de febrero de 2016] Disponible en: [http://exocarta.org/browse\\_results\\_mirna?org\\_name=&cont\\_type=mirna&tissue=&gene\\_symbol=](http://exocarta.org/browse_results_mirna?org_name=&cont_type=mirna&tissue=&gene_symbol=)
- 14) Ondarza RN. Virus y enfermedad: Conceptos actuales de los virus de importancia médica. México: Trilla; 2011: 171-177.
- 15) Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*; 2011; 1 (15): 33-43.
- 16) Dengue fever virus (DEN 1, DEN 2, DEN 3, DEN 4) - Pathogen safety data sheet. PublicHealth Agency of Canadá; 2014.
- 17) Avendaño Carvajal LF, Ferrés Garrido M, Spencer Ossa E. *Virología clínica*. Chile: Mediterraneo; 2011: 257-267.
- 18) Rojas-Espinosa O. *Inmunología (de memoria)*. 3a ed. Argentina: Editorial médica panamericana; 2006: 113-145, 261-286.

- 19)Crill WD, Roehring JT. Monoclonal antibodies that bind to domain II of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to vero cells. *Journal of Virology*; Ago 2001: 75 (16): 7769-7773.
- 20)Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, Larquet E, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *PNAS*. 2011: 108 (19): 8003-8008.
- 21)Fan J, Liu Y, Yuan Z. Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. *Virol Sin*. 2014: 29 (3): 162-169.
- 22)Pieroni L, Santolini E, Fipaldini C, Pacini L, Migliaccio G, La Monica L. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *Journal of Virology*; Sep 1997: 71 (9): 6373-6380.
- 23)Salazar Montes A, Sandoval Rodríguez A, Arméndaris Borunda J. *Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: McGraw Hill interamericana editores; 2013: 237.
- 24)Asabe SI, Tanji Y, Satoh S, Kaneko T, Kimura K, Shimotohno K. The N-Terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *Journal of Virology*; Ene 1997: 71 (71): 790-796.
- 25)Talarico LB. La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales. *Revista Química Viva*; 2008: 2: 113-133.
- 26)Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*; Ene 2004: 427: 313-319.

- 27) Pierson TC. Viral Pathogenesis: Flavivirus replication [web] USA: National Institute of Allergy and Infectious Diseases [última revisión el 02 de noviembre de 2012, consultado el 22 de agosto de 2015] disponible en: <http://www.niaid.nih.gov/labsandresources/labs/aboutlabs/lvd/viralpathogenesissection/Pages/default.aspx>.
- 28) Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leuk Biol*; Feb 2012; (91): 299-309.
- 29) Pérez Álvarez D. Exosomas de células dendríticas: biología y aplicaciones clínicas. España: Universidad autónoma de Barcelona.
- 30) Théry C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and characterization of Exosomes from Cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*; 2006: 3.22.1-3.22.29.
- 31) Molina Berenguer M. Exosomas: composición, biogénesis y función [artículo en internet] *Biología celular y molecular del sistema inmunitario* [publicado el 19 de mayo de 2015, consultado el 20 de agosto de 2015] disponible en: <http://immunology.blogs.upv.es/2015/05/19/exosomas-composicion-biogenesis-y-funcion/>
- 32) Rani S, O'Brien K, Kelleher F, Corcoran C, Germano S, Radomski M, et al. Isolation of exosomes for subsequent mRNA, microRNA, and protein profiling. *Gene Expression Profiling: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology*: Lorraine O'Driscoll Ed; 2011: 784: 181-195.

- 33)Liao J, Liu R, Yin L, Pu Y.Expression Profiling of Exosomal miRNAs Derived from Human Esophageal Cancer Cells by Solexa High-Throughput Sequencing. *Int J Mol Sci.* 2014; 15 (9):15530-15551.
- 34)Escalera-Cueto M, Medina-MArtínez I, del Ángel RM, Berumen-Campos J, Gutiérrez-Escolano AL, Yocupicio-Monroy M. Let-7c overexpression inhibits virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. *Virus research*; 2015: 196: 105-112.
- 35)Hong J, Maoshan C, Greening DW, weifeng H, Rai A, Wenwei Z, Simpson RJ. Deep Sequencing of RNA from Three Different Extracellular Vesicle (EV) Subtypes Released from the Human LIM1863 Colon Cancer Line Uncovers Distinct Mirna-Enrichment Signatures. *Plos one*; 2014: 10 (9).
- 36)Hui Y, Yanhe Z, Yanxia L, Yuhua D, Santhosh P, Xianguang C. miR-252 of the asian tiger mosquito *Aedes albopictus* regulates dengue virus replication by supressin the expression of denge virus envelope protein. *Jor Med Vir*; 2014: 86: 1428-1836.
- 37)Hui L, Fabbri M, Calin GA. MicroRNA and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature*; 2013: 12: 847-865.
- 38)Kukumani PK, Ponia SS, Rajgokul KS, Sood V, Chinnappan M, Banerjea AC, Medigeshi GR. Role or RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *Jor Vir*; 2013: 16 (87): 8870-8883.
- 39)Wahid F, Shehzad A, Khan T, You Young K. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*; 2010: 1803: 1231-1243.

- 40) Jinju H, Yoontae L, Kyu-Hyun Y, Young-Kook K, Hua J, V.Narry K. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004; 18: 3016-3027.
- 41) Jinju H, Yoontae L, Kyu-Hyeon Y, Jin-Wu N, Inha H, Je-Keun R, Sun Young S, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 2006; 125 (5): 887-901.
- 42) Yan Z, Cullen BR. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem.* 2005; 280 (30): 27595-27603.
- 43) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Kazuko N, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005; 436 (7051): 740-744.
- 44) Yoontae L, Inha H, Seong-Yeon P, Young-Kook K, Mi Ra S, V.Narry K. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 2006; 25 (3): 522-532.
- 45) Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell.* 2007; 131 (6): 1097-1108.
- 46) Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *PNAS*; 2012: 2110-2116.
- 47) Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011; 13 (4): 423-433.

- 48)Huang X, Yuan T, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*; 2013: 14 (319).
- 49)Jerry Zon [blog en internet] Exosomes: Tiny Packets of RNAs with Major Significance and Potential. [Publicado el 23 de septiembre de 2013, consultado el 22 de enero de 2016]. Disponible en: <http://zon.trilinkbiotech.com/2013/09/23/exosomes-tiny-packets-rnas-major-significance-potential/>
- 50)Hunt NG, Rome S, Jalabert A, et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. *PLOS ONE*; 2013; 8 (3).
- 51)Yiming Q, Ying L, Lin Z, Junqi H. microRNA expression profiling and bioinformatic analysis of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cells. *Mol Med Rep*; 2013: 7: 791-798.
- 52)Aloia A, Abraham AM, Bonder CS, et al. Dengue virus-induced inflammation of the endothelium and the potential roles of sphingosine kinase-1 and microRNAs. *Hindawi*; 2015; 2015.
- 53)Xhu Z, Zhenjian H, Yiwen H, Weitao W, Cuiji L, Jianchen Y, Jing P, et al. MicroRNA-30e\* supresses dengue virus replication by promoting NF-κB-Dependent INF production. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 2014: 8 (8).
- 54)Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MA, Bernard A, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature*; Apr 2011: (282) 2: 1-10.

- 55)Ruíz Jiménez F. Aislamiento y caracterización de exosomas producidos por células U937-DC-SIGN infectadas por DENV [Tesis de maestría]. México: CINVESTAV; noviembre de 2015: 1-16, 21-23, 28-35.
- 56)Marcilla A, de Almeida IC, Osuna A, del Portillo HA. Workshop: extracellular vesicles and parasites. México: International Congress of Parasitology - ICOPA; 2014.
- 57)TRIzol Reagent. Ambion by Life Technologies. Manual MAN0001271. 2012.
- 58)TRIzol Plus RNA Purification Kit. Ambion by Life Technologies. Manual MAN0000561. 2010.
- 59)Total Exosome RNA and Protein Isolation kit. Invitrogen by Life Technologies. Manual MAN0006962. 2014.
- 60)miRBASE. [Compilación en Internet] Manchester. [Visitado el 20 de septiembre de 2016] Disponible en: <http://www.mirbase.org/>
- 61)Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. Nucleic Acids Research. 2004: 32: D109-D111.
- 62)Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, et al. A uniform system for microRNA annotation. RNA journal. 2003: (9): 277-279.
- 63)Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Research. 2011: 39: D152-D157.
- 64)Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Research. 2014: 42: D68-D73.

- 65)Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 2006; 34: D140-D144.
- 66)Griffiths-Jones S, Kaur Saini H, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*. 2008; 36: D154-D158.
- 67)Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, et al. Criteria for annotation of plant microRNAs. *The Plant Cell*. Dec 2008; 20: 3186-3190.
- 68)miRanda-mirSVR [Base de datos en internet] USA: The Computational Biology Center (cBio) at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC). [Visitado el 20 de septiembre de 2016] Disponible en: <http://www.microrna.org/>
- 69)Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C and Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*., *Genome Biology*. 2003; 5: R1.
- 70)miRDB [Base de datos en internet] [Visitado el 20 de septiembre de 2016] Disponible en: <http://mirdb.org/>
- 71)Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43 (D1): D146-152.
- 72)Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biology*. 2010; 11: R90.
- 73)Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Bates Congdon C. Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in genetics*. 2014; 5 (23).

- 74)Wang X, El Naqa IM. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics*. 2008: 24(3): 325-332.
- 75)Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. 2008: *RNA journal*: 14(6): 1012-1017
- 76)Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008: 36: D149-153.
- 77)Wang X. Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-Ligation studies. *Bioinformatics*. 2016: 32(9) :1316-1322.
- 78)John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2005: 3(7): e264.
- 79)TaqMan Small RNA Assays Protocol. Applied Biosystems by Life Technologies. Manual 4364031 Rev. E. 2011
- 80)NCBI [Base de datos en Internet] USA: National Library of Medicine [Visitado el 25 de septiembre de 2016] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 81)Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt EM. *Inmunología fundamentos*. 11a ed. Editorial Panamericana; México. 2006: 201.
- 82)Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. 4a ed. Harcourt Brace; España. 1998: 9.2-9.12.
- 83)Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen A, Paludan SR. Lambda Interferon (IFN- $\lambda$ ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo. *Jor of Vir*. May 2006: 4501-4506.

- 84) Baumjohann D, Ansel M. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunology*. 2013.
- 85) Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, Gohda J, Akiyama T, Semba K, Goto H, et al. TRAF6 Establishes Innate Immune Responses by Activating NF- $\kappa$ B and IRF7 upon Sensing Cytosolic Viral RNA and DNA. *Plos One*. 2009; (5) 4.
- 86) Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Inmunología básica y clínica*. 10a ed. Manual Moderno; México. 2003: 517.
- 87) Dhib-Jalbut S, Jiang H, Williams GJ. The effect of interferon  $\beta$ -1b on lymphocyte-endothelial cell adhesion. *Jor of Neuroimmunology*. 1996; (71): 215-222.
- 88) Lemaire R, Winne A, Sakissian M, Lafyatis R. SF2 and SRp55 regulation of CD45 exon 4 skipping during T cell activation. *Eur J Immunol*. 1999; (29): 823-837.
- 89) Turka LA, Kanner SB, Schieven GL, Thompson CB, Ledbetter JA. CD45 modulates T cell receptor/CD3-induced activation of human thymocytes; via regulation of tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol*. 1992; 22 (2): 551-557.
- 90) Novak TJ, Farber D, Leitenberg D, Hong SC, Johnson P, Bottomly K. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity*. 1994; 1 (2): 109-119.
- 91) Lorenz HM, Lagoo AS, Hardy KJ. The cell and molecular basis of leukocyte common antigen (CD45)-triggered, lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1-dependent leukocyte adhesion. *Blood*. 1994; 83 (7): 1862-1870.
- 92) Bernard G, Zoccola D, Ticchioni M, Breittmayer-, Aussel C, Bernard A. Engagement of the CD45 molecule induces homotypic adhesion of human

- thymocytes through a LFA-1/ICAM-3-dependent pathway. *J Immunol.* 1994; 152: 5161-5170.
- 93) Lindell DM, Standford TJ, Mancuso P, Leshen ZJ, Huffnagle GB. Macrophage Inflammatory Protein 1 /CCL3 Is Required for Clearance of an Acute *Klebsiella pneumoniae* Pulmonary Infection. *Infection and immunity.* 2001; 69 (10): 6364-6369.
- 94) Cook DN. The role of MIP-1 $\alpha$  in inflammation and hematopoiesis. *J of Leuk Biol.* 1996; 59 (1): 61-66.
- 95) Tantawy Aly M, Hasan Alieldin N, Abdel Hamid S, Saed H, Ali Abdel-Wahab A. The Liver MicroRNA Expression Profiles Associated With Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Genotype-4 Infection: A Preliminary Study. *Hepat Mon.* 2016; 16 (4): e33881.
- 96) Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100 (7): 608-614.
- 97) Jayanta S, Sharma V. Dengue and its effects on liver. *World J Clin Cases.* 2015; 3 (2): 125-131.
- 98) Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, Fournier MV, et al. Increased Production of Interleukin-8 in Primary Human Monocytes and in Human Epithelial and Endothelial Cell Lines after Dengue Virus Challenge. *J of Vir.* 2002; 76 (11): 5588-5597.

- 99) Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Leads to Chemokine Production, Complement Activation, and Apoptosis. *J Immunol*. 1998; 161: 6338-6346
- 100) Fibbe WE, Pruijt JFM, van Kooyk Y, Figdor CG, Opendakker G, Willemze R. The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization. *Seminars in Hematology*. 2000; 37 (1): 19-24.
- 101) Colpitts TM, Barthel S, Wang P, Fikring E. Dengue Virus Capsid Protein Binds Core Histones and Inhibits Nucleosome Formation in Human Liver Cells. *Plos one*. 2011; 6 (9): e24365.
- 102) Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004; (117): 1281-1283.
- 103) Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, Asakawa M, Kawasumi M, Kobayashi T, Morioka H, Chiba K, Toyama Y, Yoshimura A. IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol*. 2011; 23 (11): 701-712
- 104) Busch-Dienstferting M, González-Rodríguez S. IL-4, JAK-STAT signaling, and pain. *Landes Bioscience*. 2013; 2 (4): e27638.
- 105) O'Neill LAJ. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nature Reviews* [Publicación online]. 9 de junio de 2006.

## XII. ANEXOS

### 12.1. Preparación de reactivos

<b>Buffer de carga de proteínas</b>		
TRIS 1 M pH 6.8	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	1.25 mL
SDS al 10 %	NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub>	4.00 mL
2-mercaptoetanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	1.00 mL
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	3.25 mL
Azul de bromofenol al 1 %	C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	0.50 mL
		Agua destilada cbp <b>10 mL</b>
<b>Buffer de electroforesis de proteínas 10X (4L)</b>		
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	576 g
TRIS	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	120 g
SDS	NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub>	40 g
		Agua destilada cbp <b>4 L</b>
<b>Medio de diferenciación U937 DC-SIGN</b>		
Medio DMEM completo con SFB 5% sin exosomas		75 mL
Medio Advance RPMI 1640 completo con SFB 5%		175 mL
		Volumen final de <b>250 mL</b>
<b>TBS 20X pH 7.8</b>		
TRIS	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	48.4 g
Cloruro de sodio	NaCl	160 g
		Agua destilada cbp <b>1 L</b>
Ajustar pH con HCl		
<b>PBS 10X pH 6.8</b>		
Cloruro de Sodio	NaCl	8.06 g
Cloruro de Potasio	KCl	0.22 g
Bifosfato de sodio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
Fosfato diácido de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g
		Agua destilada cbp <b>1 L</b>
<b>TAE 50X</b>		
TRIS	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	242.0 g
Ácido acético glacial	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	57.1 mL
EDTA de sodio	Na <sub>4</sub> C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	18.6 g
Agua destilada		800 mL
Ajustar pH a 7.2 con ácido acético y aforar a <b>1 L</b>		
<b>Buffer Stock de lavado para extracción de RNA</b>		
EDTA de sodio	Na <sub>4</sub> C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	1 mM
TRIS HCl	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl	10 mM
Completar volumen con agua destilada y ajustar pH a 8		
<b>Buffer de lavado para extracción de RNA</b>		
Buffer stock		18.75 mL
Etanol absoluto	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	29.70 mL
Agua DEPC		1.55 mL
		<b>50.00 mL</b>

12.2. Datos completos de resultados

12.2.1. Perfil de expresión de miRNA's

Valores de Ct y dE para la amplificación del miR-146a-5p

Tiempo	Repetición	Ct Infección	Ct Mock	dE	Error estándar
12 h A	1	31.0496	22.2624	-0.3947	±0.0302
	2	31.1332	22.2007	-0.4024	
	3	31.2942	22.0303	-0.4205	
12 h B	1	26.6536	21.9527	-0.2141	
	2	26.1715	21.3357	-0.2267	
	3	26.3359	21.3892	-0.2313	
12 h C	1	24.6665	21.9329	-0.1246	
	2	24.2465	21.3892	-0.1336	
	3*	24.8876	28.5161	0.1272	
24 h A	1	28.6623	22.6429	-0.2658	±0.0143
	2	28.8287	22.3865	-0.2878	
	3	28.7150	22.4957	-0.2765	
24 h B	1	26.5148	23.6515	-0.1211	
	2	26.1596	23.0806	-0.1334	
	3	26.4379	23.3493	-0.1323	
24 h C	1	26.0810	21.5636	-0.2095	
	2	26.0799	21.4521	-0.2157	
	3	26.1560	21.8133	-0.1991	
48 h A	1	30.3104	25.1385	-0.2057	±0.0599
	2	31.7813	25.5287	-0.2449	
	3*	29.4622	12.1472	-1.4254	
48 h B	1	23.9111	22.8711	-0.0455	
	2	24.6250	22.3511	-0.1017	
	3	23.6783	27.5381	0.1402	
48 h C	1	24.2606	31.1219	0.2205	
	2	22.7910	31.8499	0.2844	
	3*	24.6475	27.9347	0.1177	
72 h A	1	25.3150	23.1369	-0.0941	±0.0296
	2	26.0099	23.2895	-0.1168	
	3	28.0838	23.2521	-0.2078	
72 h B	1	22.8814	22.7425	-0.0061	
	2	23.6972	22.2550	-0.0648	
	3*	22.4576	27.4794	0.1827	
72 h C	1*	21.7375	30.5265	0.2879	
	2*	9.6201	31.3125	0.6928	
	3*	22.8986	27.4162	0.1648	

\*Datos excluidos del análisis

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNA's PRESENTES EN EXOSOMAS DE CÉLULAS MONOCÍTICAS INFECTADAS POR DENGUE VIRUS

Valores de Ct y dE para la amplificación del Let-7e-5p

Tiempo	Repetición	Ct Infección	Ct Mock	dE	Error estándar
12 h A	1	26.4770	22.3364	-0.1854	±0.0207
	2	27.0198	22.4000	-0.2062	
	3	26.8534	22.2911	-0.2047	
12 h B	1	26.1533	22.1850	-0.1789	
	2	26.6946	22.3551	-0.1941	
	3	26.5020	22.3431	-0.1861	
12 h C	1	23.9116	22.2006	-0.0771	
	2	23.9458	22.3810	-0.0699	
	3	23.9116	22.4924	-0.0631	
24 h A	1	33.3224	27.6322	-0.2059	±0.0180
	2*	31.6013	27.0586	-0.1679	
	3	33.2194	27.3099	-0.2164	
24 h B	1	29.6943	27.9795	-0.0613	
	2	29.0974	27.9136	-0.0424	
	3	29.4989	27.8362	-0.0597	
24 h C	1	27.8724	26.0908	-0.0683	
	2	26.4290	25.3695	-0.0418	
	3	27.5134	25.6616	-0.0722	
48 h A	1	21.1091	21.5385	0.0199	±0.0110
	2	21.1361	21.2322	0.0045	
	3	21.1718	21.2673	0.0045	
48 h B	1	23.1793	21.0513	-0.1011	
	2	23.1660	21.2759	-0.0888	
	3	22.8613	21.3424	-0.0712	
48 h C	1	21.8675	22.0862	0.0099	
	2	21.7540	21.8154	0.0028	
	3	21.6089	22.0018	0.0179	
72 h A	1	29.0212	24.1513	-0.2016	±0.0186
	2	29.2689	24.2225	-0.2083	
	3*	28.0640	24.0403	-0.1674	
72 h B	1	25.4301	24.5814	-0.0345	
	2	25.3041	24.3772	-0.0380	
	3	25.3260	24.5187	-0.0329	
72 h C	1	28.0901	26.5074	-0.0597	
	2	27.9940	26.3417	-0.0627	
	3	27.7575	26.4902	-0.0478	

\*Datos excluidos del análisis

## Valores de Ct y dE para la amplificación del miR-29c-3p

Tiempo	Repetición	Ct Infección	Ct Mock	dE	Error estándar
12 h A	1	37.4619	27.0024	-0.3874	±0.0191
	2	36.5288	27.1837	-0.3438	
	3	38.2860	27.2270	-0.4062	
12 h B	1	38.1265	32.4720	-0.1741	
	2	39.5807	31.7591	-0.2463	
	3*	36.8469	32.2750	-0.1417	
12 h C	1	37.4477	27.7670	-0.3486	
	2	37.8403	28.6669	-0.3200	
	3	37.2517	27.6963	-0.3450	
24 h A	1	42.3161	36.1112	-0.1718	±0.0357
	2	43.6716	35.9894	-0.2135	
	3	43.2768	36.0542	-0.2003	
24 h B	1	37.0169	38.0512	0.0272	
	2	37.0197	37.2217	0.0054	
	3	36.9018	37.3528	0.0121	
24 h C	1	38.6101	29.2008	-0.3222	
	2*	37.0857	29.0527	-0.2765	
	3	38.1163	29.1994	-0.3054	
48 h A	1	29.0175	29.1610	0.0049	±0.0130
	2	29.4913	30.0550	0.0188	
	3	30.5891	30.1831	-0.0135	
48 h B	1	34.5193	30.2563	-0.1409	
	2	34.1265	31.5933	-0.0802	
	3	34.1008	32.3170	-0.0552	
48 h C	1	28.1223	27.0402	-0.0400	
	2*	26.8277	27.1988	0.0136	
	3	28.4463	28.1229	-0.0115	
72 h A	1	51.4781	45.9898	-0.1193	±0.0490
	2	51.3695	47.8243	-0.0741	
	3*	0.0000	46.7539	1.0000	
72 h B	1	48.1772	41.6016	-0.1581	
	2	48.2949	45.7534	-0.0555	
	3*	46.9847	44.1620	-0.0639	
72 h C	1	49.5449	35.0294	-0.4144	
	2	50.4800	35.4135	-0.4254	
	3	49.7277	35.2414	-0.4111	