



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
UNIDAD ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE VIROLOGÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE DEL ISSSTE



**Perfil proteómico de exosomas secretados por
macrófagos U937 DC-SIGN infectados con DENV-2 y
efecto del contenido exosomal en la replicación viral**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

Q.B.P. Juan Manuel Urucha Ortíz

Director de tesis

Dr. Óscar del Moral Hernández

Codirectora de tesis

Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada

Comité tutorial

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dra. Gloria Fernández Tilapa



Chilpancingo, Gro; Enero del 2020




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 09 días del mes de diciembre de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Perfil proteómico de exosomas secretados por macrófagos U937 DC-SIGN infectados con DENV-2 y efecto del contenido exosomal en la replicación viral", presentada por el alumno Juan Manuel Urucha Ortiz, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

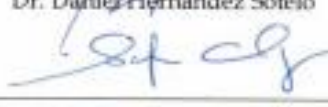
El Comité Tutorial


Dr. Oscar del Moral Hernández
Dirección de tesis




Dr. Eduardo Castañeda Saucedo


Dr. Daniel Hernández Sotelo


Dra. Gloria Fernández Tilapa


Dra. Sofia Lizeth Alcaráz Estrada

Vo. Bo


Daniel Hernández Sotelo
Director de la Maestría en Ciencias Biomédicas
 DIRECCIÓN 2018 - 2021

Vo. Bo

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Virología en la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, bajo la dirección de:

Dr. Oscar del Moral Hernández

y el laboratorio de unidad de análisis y referencia virológica perteneciente a la división de genómica del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE, bajo la codirección de:

Dra. Sofía Lizeth Alcaráz Estrada

Durante el periodo en el que el C. Juan Manuel Urucha Ortiz cursó la maestría en Ciencias Biomédicas, recibió la beca CONACYT con número 857963.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el **Dr. Oscar del Moral Hernández** por darme la confianza de realizar este trabajo de investigación en el laboratorio de virología de esta institución. Agradezco cada una de sus aportaciones, consejos para la elaboración de este proyecto y la amistad brindada por años.

A la **Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada** quien fue la co-directora de este trabajo y me dio la oportunidad de pertenecer a su laboratorio en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE en la ciudad de México. Dra. Le agradezco la confianza, sus enseñanzas en el laboratorio y la amistad.

A la **Dra. Martha Yocupicio Monroy** por sus consejos y enseñanzas en su laboratorio en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

A mis sinodales el **Dr. Daniel Hernández**, la **Dra. Gloria Fernández** y al **Dr. Eduardo Castañeda** por brindarme sus observaciones y consejos que hicieron este trabajo posible.

Al **M.C. Adrián González** por todo el apoyo brindado en este trabajo y por su amistad

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme formar parte del programa nacional de becas

DEDICATORIAS

A mi familia por haberme apoyado en todo este tiempo y confiar en mí, en especial a mis padres por sus consejos y apoyo moral.

A Adrián y Rosy, mis compañeros de laboratorio en este trabajo y con quienes compartí muchos momentos gratos. También a todos los amigos que pude hacer durante mi estancia en la CDMX.

A mis amigos de la maestría Isimar, Miriam, Jessica D, Luis y Brianda. Fue un gusto haber podido compartir aula con ustedes.

A mi madrina Bety. Sabes que te tengo un gran cariño y me da gusto haber contado contigo en todo momento durante esta maestría. Agradezco bastante tu apoyo y consejos.

A Anita por su amistad de años y estar dispuesta a hablar conmigo siempre, aconsejarme y hacerme entrar en razón cuando se necesitó (no fueron tantos).

A todo el laboratorio de LBCC con quienes tuve la oportunidad de convivir en mis últimos días en esta institución y me brindaron su amistad.

Con una dedicatoria especial a Yunue Bello por haberme ayudado a realizar este proyecto y darme el apoyo moral en absolutamente todas las situaciones que se presentaron durante este trayecto.

Índice

Contenido	Pág
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN.....	25
PERSPECTIVAS	28
REFERENCIAS.....	29

RESUMEN

Introducción: El dengue es una enfermedad causada por el virus del dengue. Las células dendríticas, monocitos y macrófagos, son las principalmente infectadas por este virus y estas células liberan exosomas durante la infección. La secreción de exosomas por las células infectadas por virus DENV puede mejorar la respuesta inmune o favorecer la evasión viral. **Objetivo:** Analizamos el perfil proteómico de exosomas secretados por macrófagos U937 DC-SIGN infectados con DENV2 y efecto del contenido exosomal en la replicación viral. **Material y métodos:** Se utilizaron las líneas celulares U937 DC-SING y VERO para infección con exosomas. La expresión del proteoma se analizó 24 h después de la infección usando LC-MS, validamos el análisis proteómico midiendo los niveles de expresión de TLN1 en la célula y los exosomas con RT-qPCR y *western blot*. Se utilizó la línea celular BHK para los ensayos de plaqueo viral. Adicionalmente, evaluamos el efecto de los exosomas de células VERO con un replicón del DENV 4. **Resultados:** Se encontraron 130 proteínas en los exosomas provenientes de macrófagos infectados y no infectados expresadas diferencialmente; 52 de ellas estaban aumentadas y 77 disminuidas. Los niveles de expresión de TLN1 disminuyen a nivel postraduccional a las 12, 24 y 48 h Además, las células tratadas con exosomas provenientes de células infectadas por DENV2 inhibieron la replicación viral comparada con las células que no fueron tratadas con los exosomas, y observamos que reducen la replicación viral en células previamente tratadas con estos exosomas. **Conclusiones:** La infección por el DENV 2 modifica el perfil proteómico de los exosomas secretados por los macrófagos U937 DC-SING y la expresión de la proteína Talina 1 aumenta a nivel transcripcional a partir de las 6 hpi. Y que los exosomas de células VERO no infectadas y VERO R4 reducen la replicación viral.

Palabras clave: Exosomas, DENV 2, TLN1, LC-MS, replicación viral.

ABSTRACT

Introduction: Dengue is a disease caused by dengue virus. Dendritic cells, monocytes and macrophages, are mainly infected by this virus and these cells release exosomes during infection. Exosome secretion by cells infected by the DENV virus can improve the immune response or favor viral evasion. **Objective:** To analyze the proteomic profile of exosomes secreted by U937 DC-SIGN macrophages infected with DENV2 and the effect of exosomal content on viral replication. **Material and methods:** use the U937 DC-SING and VERO mobile lines for infection with exosomes. Proteome expression was analyzed 24 hours after infection using LC-MS, we validated proteomic analysis by measuring the levels of TLN1 expression in the cell and exosomes with RT-qPCR and western blot. The BHK cell line was analyzed for viral plating assays. In addition, it evaluates the effect of VERO cell exosomes with a DENV 4 replicon. **Results:** 130 proteins were found in exosomes from differentially expressed and infected macrophages; 52 of them were increased and 77 decreased. TLN1 expression levels decrease at the post-translational level at 12, 24 and 48 hours, and cells treated with exosomes from DENV2-infected cells inhibit viral replication compared to cells that were not treated with exosomes, and we observe that reduce viral replication in cells previously treated with these exosomes. **Conclusions:** DENV 2 infection modifies the proteomic profile of exosomes secreted by U937 DC-SING macrophages and the expression of Talin 1 protein increases the transcriptional level after 6 hpi. And that exosomes from uninfected VERO and VERO R4 cells reduce viral replication.

Key words: Exosomes, DENV 2, TLN1, LC-MS, viral replication.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad febril que puede desarrollarse como fiebre por dengue (FD) o fiebre hemorrágica por dengue (FHD); es causada por el virus Dengue (DENV), el cual es transmitido principalmente por el vector *Aedes aegypti*. El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae*, y se divide en cuatro serotipos genéticamente similares en un 65% (DENV 1 al 4). El DENV mide aproximadamente 50 nm y tiene un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo de 10.7 kb, que codifica para una poli-proteína precursora de 3,391 aminoácidos. La poli-proteína del DENV está compuesta por tres proteínas estructurales: a) la proteína C de la cápside, b) la proteína M de la membrana y c) la proteína E de la envoltura y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

El anclaje del DENV a las células blanco depende de la interacción entre las proteínas de la superficie celular con los componentes de la capsida viral. La susceptibilidad de los tejidos del huésped al virus depende de la abundancia y distribución de los receptores celulares. Hasta ahora no se ha identificado definitivamente un receptor específico para DENV. Sin embargo, han surgido varios candidatos de distinta naturaleza en células de mamíferos, incluidos los glicosaminoglicanos, como el heparán sulfato y las lectinas, la molécula de adhesión de las células dendríticas (DC-SIGN), el receptor de manosa (MR) de macrófagos, el receptor de lipopolisacárido (LPS) CD14 y proteínas inducidas por el estrés, como las proteínas de choque térmico 70 y 90. El receptor DC-SIGN es considerado el principal receptor del DENV, debido a esto, las células dendríticas son más susceptibles a la infección por DENV (Tassaneetrithep *et al.*, 2003).

Las células dendríticas infectadas maduran y migran a los ganglios linfáticos para presentar antígenos virales a las células T CD4+, activando la respuesta inmune celular y humoral. Como consecuencia, se liberan altas cantidades de citocinas y quimiocinas que incluyen IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL 13, IL-18, IFN- γ , TNF- α y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). Esta tormenta de citocinas, aunque no en todos los casos, está asociada al desarrollo de la FHD, el efecto mortal de la infección por DENV ocurre por la desestabilización de la barrera endotelial

microvascular, que resulta en una fuga de plasma, shock hipovolémico y en última instancia, hemorragias masivas (Bhatt S, *et al.*, 2013).

Sin embargo, solo un pequeño porcentaje (2%) de las células endoteliales se infectan de forma productiva *in vitro* por DENV, sin apoptosis significativa (Aloia *et al.*, 2015). Esto podría deberse a que otros tipos celulares como los monocitos, macrófagos o linfocitos podrían ser la causa principal de la extensa fuga vascular observada en la fiebre hemorrágica del dengue (Mishra *et al.*, 2019). Tras la infección por DENV, las células inmunes responden mediante la secreción de una cantidad extraordinaria de factores proinflamatorios (microARN, factores de transcripción, citocinas y quimiocinas) en el torrente sanguíneo para desencadenar el síndrome de hiperpermeabilidad (Patro *et al.*, 2019). Esto sugiere la posibilidad de que pequeñas microvesículas sean secretadas y transporten factores proinflamatorios y los distribuyan a nivel sistémico (Mishra *et al.*, 2019).

Dada la importancia del papel recientemente reconocido de los exosomas en la transferencia de materiales biológicos importantes (micro-ARN/factores de transcripción/citocinas/quimiocinas) en diversas enfermedades, se ha propuesto que estas microvesículas transportan moléculas que inducen modificaciones en la función de diversas células y tejidos del hospedero y que esas alteraciones favorecen la propagación y patogénesis viral (Chahar *et al.*, 2015).

Los exosomas son pequeñas vesículas extracelulares (EV) de 30–100 nm de diámetro, secretadas por distintos tipos de células, como mastocitos, células dendríticas, linfocitos B, neuronas, adipocitos, células endoteliales, células epiteliales y monocitos (Colombo *et al.*, 2014). Son secretados a través de la vía exocítica y se encuentran en los fluidos corporales locales y circulantes. Los exosomas se originan en el endosoma multivesicular (MVE) y se liberan de las células a través de la fusión de los MVE a la membrana plasmática. Los exosomas transportan diferentes biomoléculas de una célula a otra, incluidas proteínas solubles y unidas a la membrana, lípidos, DNA, RNA, RNAm, microARN y RNA largos no codificantes. Por lo tanto, los exosomas sirven como un vehículo importante para la comunicación intra e intercelular, sin contacto directo entre

células. Debido a esta característica, los exosomas juegan un papel importante en muchos procesos biológicos, incluida la respuesta inmune y la progresión de la enfermedad, así como el desarrollo de cáncer y la propagación de infecciones virales (Khatun *et al.*, 2019). Diferentes estudios han indicado que los exosomas están asociados con la replicación, la propagación del virus, así como con la respuesta antiviral del DENV.

Se ha demostrado que las células infectadas con DENV2/DENV3 secretan exosomas que transportan el genoma completo de DENV y además, son infecciosos para las células vivas de mamíferos y mosquitos, como los queratinocitos de piel humana y las células endoteliales (Vora *et al.*, 2018). Los exosomas secretados por las células infectadas por DENV 2 también transportan LC3 II, un marcador de autofagia, además del genoma viral y las proteínas que protegen al virus de los anticuerpos neutralizantes contra el dengue, lo que permite la transmisión viral segura entre las células (Wu *et al.*, 2016). Se ha confirmado que los exosomas liberan IFITM3 (proteína transmembrana inducida por interferón 3) de células THP-1 y HepG2 infectadas con DENV a células no infectadas. Los exosomas que portan IFITM3 inducen actividades antivirales de célula a célula durante la infección por DENV. Las IFITM son proteínas transmembranales inducibles por interferón 1, 2 y 3 (IFITM1, IFITM2 e IFITM3), y potentes moléculas efectoras antivirales, conocidas por suprimir la entrada a la célula de muchos virus envueltos e influir en el tropismo celular de los virus independientemente de la expresión del receptor (Zhu *et al.*, 2015). Pei *et al.*, reportaron que proteínas del citoesqueleto como Vinculina y Tubulina se encuentran en mayor cantidad dentro de los exosomas secretados por plaquetas infectadas por DENV 2. Sin embargo, no se ha demostrado cuál es el efecto de proteínas del citoesqueleto exosomales, en las células receptoras. No obstante, diversos autores han reportado la participación del citoesqueleto durante la infección por DENV (Acosta *et al.* 2008; Chu *et al.* 2006; Chuang *et al.* 2015).

El DENV utiliza diferentes componentes del citoesqueleto para favorecer sus mecanismos de replicación, por ejemplo, la miosina asociada con filamentos de

actina está involucrada en el proceso de infección por DENV2, y la redistribución de miosina causa una liberación reducida de partículas de DENV (Xu *et al.*, 2009). Además de interrumpir la red de actina durante la entrada del virus a la célula, DENV 2 también utiliza y reorganiza los microtúbulos durante el curso de la infección (Lei *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la proteína DENV NS1 tiene afinidad por la vimentina, la cual desempeña un papel crucial en la replicación del virus, así como en la aparición de los síntomas del síndrome de choque por DENV (Kanlaya *et al.*, 2009).

Se ha observado que Talina 1 (TLN1); una proteína de adhesión focal ubicua, que une las redes intracelulares con la matriz extracelular (MEC) a través de su conexión con el citoesqueleto de actina y las integrinas de membrana (Haining, *et al.*, 2016), cambia su nivel de expresión en los diferentes cuadros clínicos de la infección por DENV, observando una menor expresión en FD comparado con la FHD. Se ha reportado un aumento de esta proteína en FHD, aunque no se ha demostrado cuál es su participación durante la infección por DENV (Fagnoud, *et al.*, 2015).

Los flavivirus y otros virus también inducen cambios en el citoesqueleto de la célula para facilitar la replicación viral (Sodeik *et al.*, 2004). Se ha comprobado que el virus de la hepatitis B (VHB) interactúa con proteínas del citoesqueleto como TLN1 y promueve su degradación vía proteosoma por efecto de la proteína X del VHB. La degradación de esta proteína es esencial y suficiente para facilitar la replicación del VHB. Cuando se sobreexpresa TLN1, la replicación viral disminuye significativamente. Estos resultados sugieren que TLN1 puede actuar como un factor que disminuye la replicación del VHB (Maarten *et al.*, 2016). Se ha reportado que TLN1 y vinculina, juegan un papel importante en la infección retroviral. La sobreexpresión transitoria de TLN1 o de vinculina reduce la susceptibilidad de las células humanas a la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Por el contrario, la reducción de TLN1 o vinculina incrementa la infección por VIH-1, lo que demuestra que las formas endógenas de estas proteínas también afectan la infección retroviral (Brown *et al.*, 2011). Por otro lado, en la infección por citomegalovirus humano (HCMV), la proteína viral pUL135 es responsable del efecto

citopático característico de las cepas clínicas de HCMV, que también lo protege del efecto citotóxico de las células natural killer (NK) y de células T. pUL135 suprime directamente la función de TLN1 y la eliminación del dominio de la proteína pUL135, que interactúa con TLN1, restaura la viabilidad celular. Stanton *et al.*, 2014).

Por los antecedentes mencionados anteriormente y con el fin de Identificar el perfil proteómico de los exosomas secretados por macrófagos U937-DC-SIGN infectados con DENV2 para conocer el impacto que podrían tener en células receptoras es necesario un conocimiento más profundo sobre el efecto del contenido exosomal, proveniente de células infectadas con DENV-2, sobre células receptoras de los exosomas y cómo las proteínas del citoesqueleto podrían influir en la infección viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus y líneas celulares

El virus Dengue serotipo 2 de la cepa de Nueva Guinea (DENV 2 NGS) se propagó en células Vero-ATCC (CCL-81™). Los títulos virales de los stocks se valoraron con ensayos de lisis en placa en células Vero. Se sembraron células U937-DC-SIGN y se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Flow Laboratories, Irvine, RU) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 8% (v / v) y libre de exosomas, con 2 mM de L-glutamina. Los cultivos se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ (Pei-wen, *et al.*, 2013).

Ensayos de placa viral

Se sembraron 125,000 células BHK-21 por pozo en placas de 24 pozos, 3 h después de la siembra se retiró el medio y las células BHK-21 se infectaron con diferentes diluciones (10^{-1} - 10^{-5}) del DENV 2 en un volumen de 200 μ L de medio sin suplementar. Las células infectadas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 2 h y se agitaron suavemente varias veces durante este periodo de adsorción. Posteriormente se añadió 1 mL de Carboxi metil celulosa (CMC) a una concentración de 0.9% y medio de cultivo suplementado a cada pozo. La placa se incubó durante 5 días a 37°C con 5% de CO₂. A continuación se retiró la CMC, se lavaron los pozos con 500 μ L de PBS 1X y se tiñeron las células con 500 μ L de cristal violeta al 1,5%, por pozo durante, 20 min. Las células se lavaron con 500 μ L PBS 1X, y luego se contaron las placas para calcular la concentración del virus inicial en unidades formadoras de placa (UFP) con la siguiente formula:

$$\text{PFU/ml del stock original} = \frac{\text{Número de placas liticas}}{\text{Factor de dilución} \times \text{ml del inóculo}}$$

Preparación del suero libre de exosomas

El suero inactivado, se centrifugó a 110, 000 x g por 2 h y se recuperó el sobrenadante. El suero sin exosomas se utilizó para suplementar el medio de cultivo de las células U937 infectadas DENV (Duelli *et al.*, 2005).

Diferenciación de monocitos U937-DC-SIGN a macrófagos

Los monocitos U937-DC-SIGN fueron diferenciados dos días previos a la cromatografía de líquidos con espectrometría de masas (LC-MS). Se sembraron 5×10^6 monocitos en cada placa, resuspendidos en 10 mL de medio de diferenciación (70% medio DMEM y 30% medio RPMI suplementados) y se agregó PMA (Thermo scientific, Massachusetts, USA). Diluido en medio a una concentración de 100 ng/mL.

Infección de macrófagos U937-DC-SIGN

Se tomaron 5×10^6 macrófagos U937 DC-SIGN, previamente diferenciados con PMA dos días antes del experimento, se incubaron a 37°C con DENV 2 (MOI 1) en medio Hanks con partículas virales por 2 h o con medio Hanks sin partículas virales para los macrófagos no infectados (Gibco, Life Technologies, New York, USA). Para posteriormente retirar el medio e incubar durante 24 h.

Aislamiento de exosomas

El sobrenadante de los macrófagos no infectados e infectados, se centrifugó a 500 RCF por 5 min y se recuperó el sobrenadante, que, se sometió a centrifugaciones sucesivas. La primera centrifugación se hizo a 2,000 RCF durante 30 min. Consecutivamente, el sobrenadante se centrifugó a 20,000 RCF durante 60 min y se pasó por un filtro de 0.2 micras (Millex-GS 0.22 μ m Thermo scientific, Massachusetts, USA). Una vez filtrado, se agregaron 0.5 volúmenes del reactivo "*Total exosome isolation*" hasta obtener una mezcla homogénea. Las fracciones se incubaron durante toda la noche a 4°C. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10,000 RCF por 1 h, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 100 μ L de PBS 1X estéril.

Extracción de proteínas totales

Se utilizó RIPA para la extracción de las proteínas celulares, se añadieron 0.5 mL de la solución amortiguadora de lisis durante 10 min. Se cosecharon las células y se colocaron en tubos Eppendorf, manteniendo siempre la suspensión celular a 4 °C. Se centrifugó 30 min a 4°C a 15, 000 rpm y se tomó el sobrenadante para alícuotarlo y almacenarlo a 80°C hasta su uso. Para lo Exosomas, se aislaron previamente los exosomas y posteriormente se extrajeron las proteínas con el mismo método.

Espectrometría de masas

Las proteínas se digirieron y se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con nano flujo y espectrometría de masas (LC–MS). Las digestiones se separaron mediante cromatografía líquida de nano flujo utilizando una columna BEH 130 C18 de fase inversa de 75 µm x 150 mm (Waters Technologies Corporation, Massachusetts, USA). A un caudal de 600 nL / min en un sistema NanoAcquity™ Ultra Performance UPLC (Waters). La fase móvil A era 0,1% de ácido fórmico en agua y la fase móvil B era 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo. Tras el equilibrio de la columna en el 2% de disolvente B, se inyectó una parte alícuota de cada digestión (5 µL correspondientes a 0,5 µg de proteína total), luego el contenido orgánico de la fase móvil se incrementó linealmente al 40% durante 150 min., y luego al 50% en 1 min. El efluente de la columna se dirigió a una fuente de iones de nanospray y se unió a un espectrómetro de masas Orbitrap de trampa de iones híbridos lineales (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Scientific, San Jose, CA). Los péptidos se analizaron en modo de ión positivo y en modo de adquisición dependiente de la información para cambiar automáticamente entre MS y MS. Los espectros de MS se adquirieron en modo perfil utilizando el analizador Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), en el rango de m/z entre 350 y 1500 a una resolución de 60,000. Para cada espectro de MS, se seleccionaron los 6 iones cargados múltiples más intensos en un umbral de 1000 conteos para realizar experimentos de CID. Los iones del producto se analizaron en el modo de centroide lineal de iones trapinio. La energía de colisión CID se ajustó

automáticamente al 35%. Se aplicó una ventana de exclusión dinámica de 0,5 Da que impidió que se seleccionara el mismo m / z durante 45 s después de su adquisición.

RT-qPCR

Se utilizó RT-qPCR para cuantificar el nivel de expresión del mRNA de Talina 1 utilizando SYBR-green (*Applied Biosystems*, California, USA.) Con el par de oligonucleotidos: sentido: 5'- TGTAGAGGAGCACGAGACGC -3' y antisentido: 5'- AAGGAGACAGGGTGGGAGC -3'. Como control endógeno se utilizó el gen GAPDH. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos usando el método delta-delta CT, ajustado a la expresión de GAPDH.

Western blot

Se adicionaron 25 µL de buffer de muestra 4 x LDS a 7 5 µL de muestra de EVs pre-aisladas, para incubar a 70°C por 10 min, después se colocaron 20 µL de c/muestra, el gel se corrió a 100 V por 1 h, se despegó el gel, posteriormente se colocó la membrana de nitrocelulosa sobre el gel, se colocó el gel en un cassette y se agregó buffer de transferencia. Se transfirió a 60 V por 1 h y se colocó en TBS-T-5%-leche y se bloqueó por 2 h, después se lavó y agregó el anticuerpo primario diluido en 10 mL de TBS-T-1%-leche e incubó a 4°C con agitación en TBS-T-1%-leche por 12 h. Después se lavó 3 veces con TBS-T por 10 min cada vez, se incubó con el anticuerpo secundario en TBS-T-1%-leche por 1 h. La membrana se lavó 6 veces durante 10 min con TBS-T a temperatura ambiente. La detección de las bandas se realizó por quimioluminiscencia.

Tratamiento de células BHK 21 con exosomas de células VERO

Se sembraron células BHK 21 (500, 000) en una placa de 24 pozos y se incubaron a 37 ° C durante 1 día, seguido de incubación con DV (MOI = 1). Alternativamente, las células BHK 21 se incubaron con exosomas de células VERO previamente infectadas, VERO R4 y VERO no infectadas.

Análisis estadístico

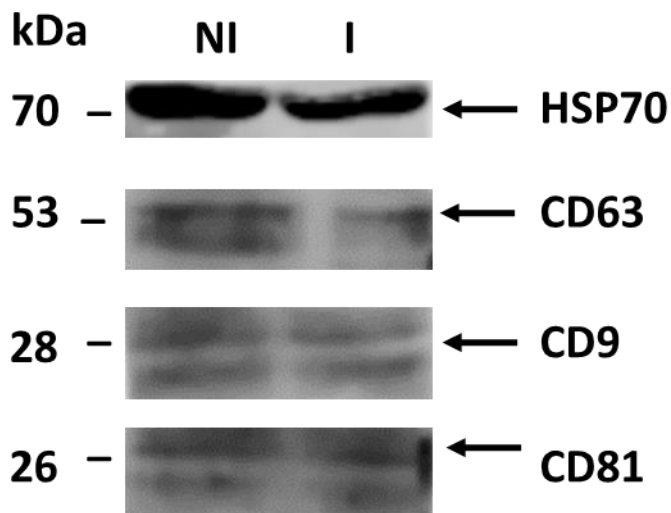
Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism (Versión 7.0) y se presentan como media \pm SEM. Para las comparaciones de dos grupos, la significación se determinó mediante una prueba t de student. Para las comparaciones de grupos múltiples, se utilizó ANOVA. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

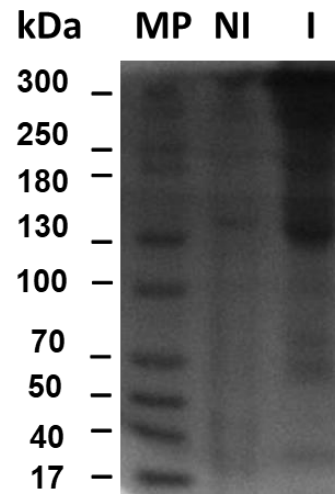
Los macrófagos infectados por DENV 2 liberan exosomas

Se obtuvieron exosomas secretados por macrófagos infectados con DENV 2 y de macrófagos no infectados. 24 h después de la infección con el virus o sin infección se verificó la presencia de exosomas mediante la expresión de las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y HSP70. (Figura 1A). Se observó el contenido proteico de los exosomas y se observó un perfil heterogéneo entre ambas muestras (Figura 1B). A través de microscopía electrónica se observó la morfología y tamaño de los exosomas provenientes de células no infectadas (Figura 1C) e infectadas (Figura 1D). Además de la morfología esférica, observamos que la mayoría de las vesículas secretadas por células infectadas son 3 veces más grandes (90 nm) en comparación con las vesículas de las células no infectadas (30 nm).

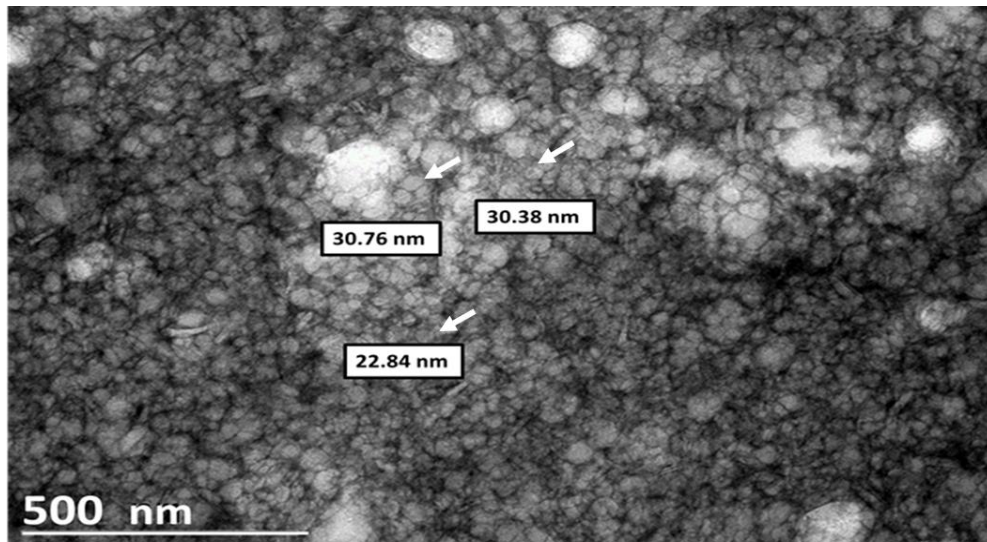
A)



B)



c)



d)

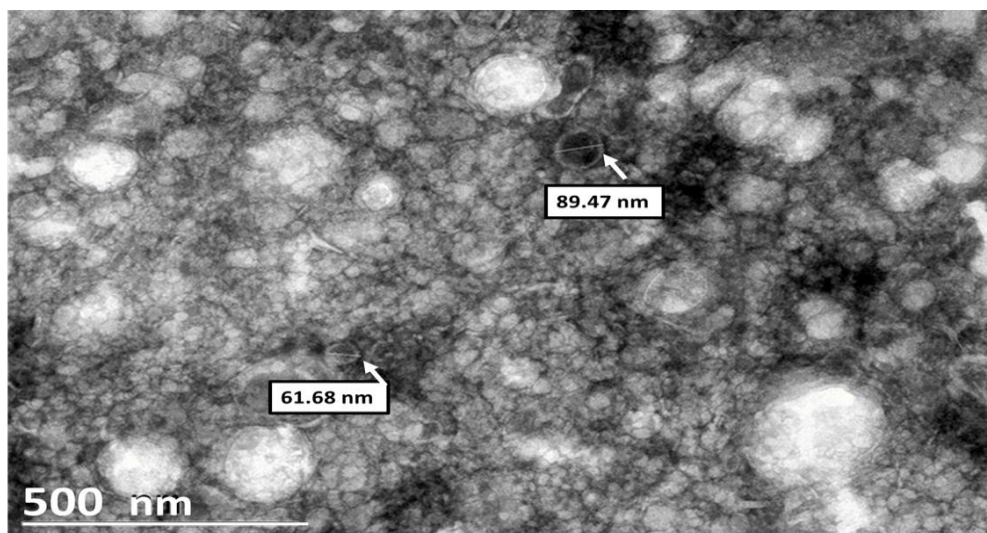


Figura 1. Los exosomas secretados por macrófagos contienen las tetraspaninas CD63, CD81, CD9 y HSP70 y cambian su tamaño por efecto de la infección viral. Se verificó la expresión de marcadores específicos de exosomas secretados por macrófagos infectados con DENV 2 y los secretados por macrófagos no infectados(A). Se verificó la presencia de proteínas en los exosomas de macrófagos no infectados e infectados (B). Los exosomas de macrófagos infectados presentan un mayor tamaño que los macrófagos de células no infectadas (C).

La infección por el DENV 2 modifica el perfil de proteínas de los exosomas secretados por macrófagos infectados.

Se detectaron 1,365 proteínas en los exosomas provenientes de macrófagos infectados con DENV 2 y macrófagos no infectados. Los resultados se filtraron y se conservaron los datos que tuvieron un cambio en el contenido exosomal de +1.5 o -1.5 veces. Se identificaron 130 proteínas expresadas de manera diferencial entre los exosomas de macrófagos infectados con DENV 2 y los no infectados, de las cuales, 52 aumentaron y 77 disminuyeron.



Figura 2. Mapa de calor que muestra los perfiles de expresión de las proteínas. El mapa de calor corresponde a los valores de expresión de las proteínas con cambios significativos. En verde están las proteínas que aumentan su concentración dentro de los exosomas y en rojo las que disminuyeron. Cada columna representa una muestra y cada fila indica una proteína.

Análisis bioinformático

El análisis de *gene ontology* (GO) fue hecho con las 77 proteínas que disminuyeron su expresión (1.5 veces o más) debido a que nos interesamos en las proteínas que podrían estar degradándose por efecto del DENV 2. Nuestros datos mostraron que las proteínas disminuidas, están asociadas a diferentes procesos biológicos, funciones moleculares y proteínas que conforman la estructura celular (Figura3).

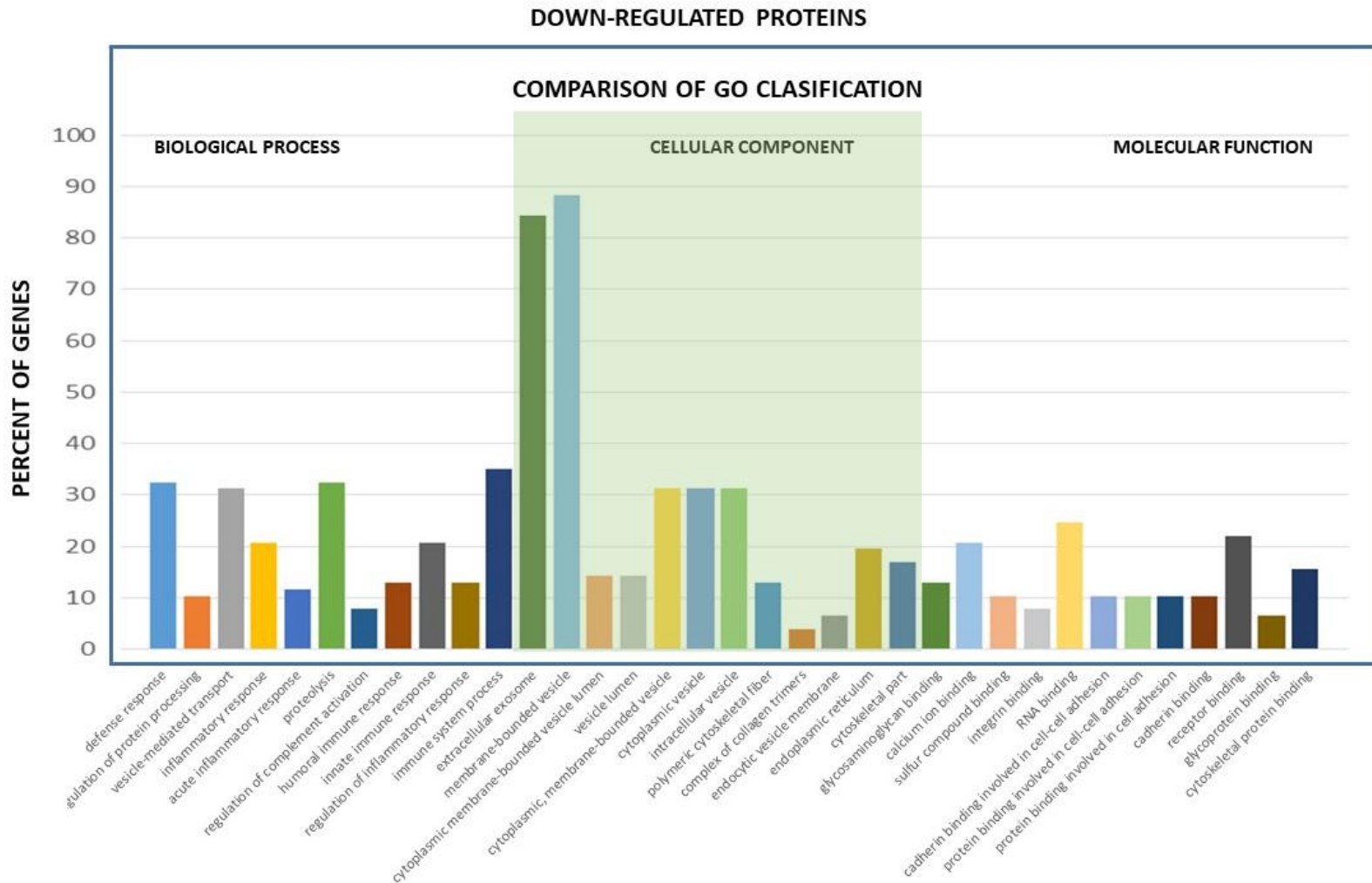
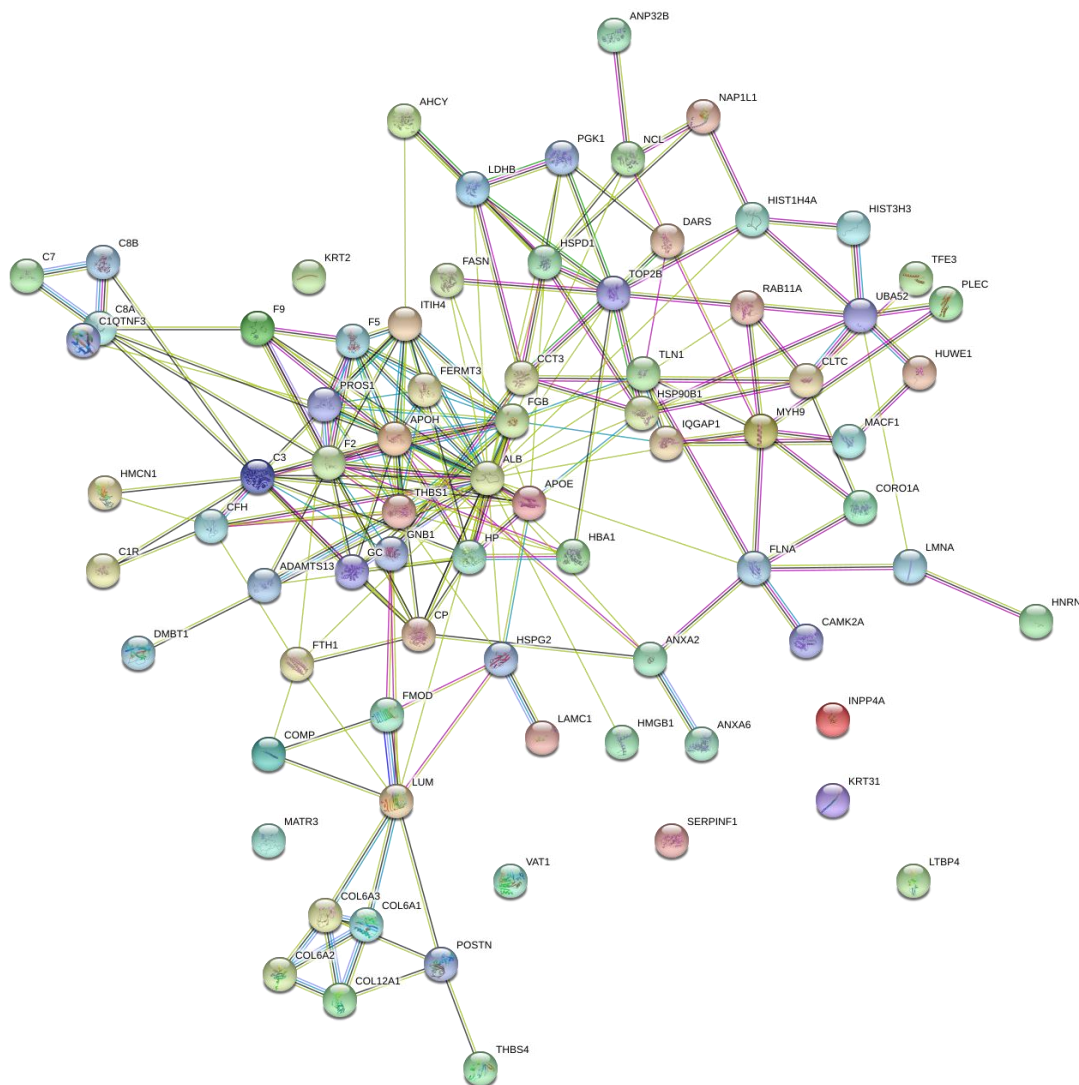


Figura 3: Gene ontology (GO). Análisis de las proteínas disminuidas con porcentaje de enriquecimiento que participan en procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. La mayoría de las proteínas que disminuyeron su expresión, participa en diversos procesos biológicos como transporte vesicular y respuesta inflamatoria, Estas proteínas componen también el lumen de las vesículas y citoesqueleto. Participan en unión de receptores y unión de integrinas. En el Eje de las Y está el porcentaje de las 77 proteínas que participan en cada proceso (eje de las X). Por la distribución de los porcentajes, podemos concluir que estas proteínas participan en más de un proceso biológico.

Se usó la base de datos STRING para identificar interacciones entre las proteínas que disminuyeron en los exosomas, por efecto de la infección con el DENV 2 (Figura 4). El análisis mostró 2 grupos de proteínas, uno que induce activación plaquetaria, conformado por 15 proteínas y otro que agrupa a 13 proteínas del citoesqueleto (Figura 4A y 4B). Se eligieron proteínas del citoesqueleto ya que se correlacionan con la respuesta antiviral de la célula y son importantes para la regulación de la transcripción viral y la entrada del virus a la célula (Tabla 1).

A)



B)

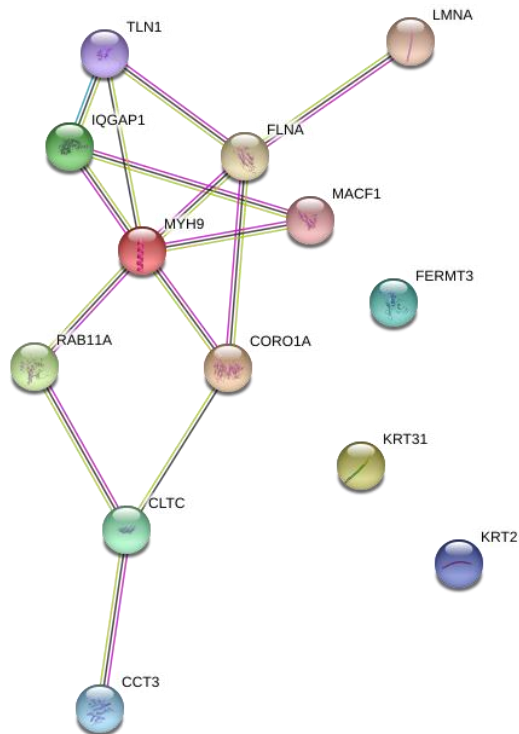


Figura 4: Redes de interacción entre proteínas, disminuidas en exosomas secretados por macrófagos infectados con DENV2. Se analizaron las proteínas que disminuyeron su contenido ≥ 1.5 veces en los exosomas de los macrófagos infectados por el DENV-2 **(A)** Red de interacción entre proteínas que inducen activación plaquetaria. **(B)** Interacción entre proteínas del citoesqueleto. **Redes construidas en la base de datos STRING.**

Tabla 1 Proteínas del citoesqueleto que disminuyeron ≥ 1.5 veces en la infección por DENV-2.

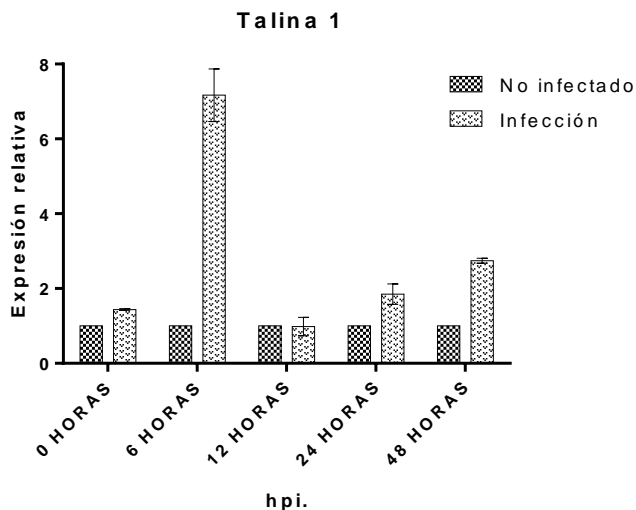
Nombre del gen	Nombre de la proteína	MOCK/ DENV-2	Péptidos	Antecedentes con virus	Referencias
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	2	4	Las interacciones del host IQGAP1 y el virus del ébola VP40 facilitan el egreso de partículas similares a virus.	(Lu <i>et al.</i> , 2013)
RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family	1.8	4	RAB11A es esencial para el transporte del genoma del virus de la influenza a la membrana plasmática.	(Eisfeld <i>et al.</i> , 2011)
CCT3	chaperonin containing TCP1 subunit 3	3	26	-----	
CLTC	clathrin heavy chain	5	46	La inhibición de CLTC afecta la multiplicación y entrada del virus del dengue en las células HepG2.	(Alhoot, Wang and Sekaran, 2011)
CORO1A	coronin 1A	2.2	7	Las infecciones virales recurrentes están asociadas con una mutación en CORO1A homocigótica que interrumpe la oligomerización y la asociación citoesquelética.	(Pick <i>et al.</i> , 2017)

FERMT3	fermitin family member 3	1.8	5	La inhibición de FERMT3 se correlacionó positivamente con la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), la invasión vascular hepática, la diferenciación tumoral deficiente y el pronóstico desfavorable del paciente	(Hu <i>et al.</i> , 2019)
FLNA	filamin A	2.7	56	Filamin A participa en la evasión mediada por Vpu de VIH-1 de la restricción del hospedador mediante la modulación de la expresión de Tetherin	(Dotson <i>et al.</i> , 2016)
KRT2	keratin 2	2.3	73	-----	
KRT31	keratin 31	2.9	5	-----	
LMNA	lamin A/C	6.3	22	Lamin A / C aumenta la diferenciación Th1 y la respuesta contra el virus de Vaccinia y Leishmania major	(Mou <i>et al.</i> , 2008)
MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1	2	6	-----	
TLN1	talin 1	2.1	47	La sobreexpresión de TLN1 suprime la replicación del VHB.	(Maarten <i>et al.</i> , 2016)

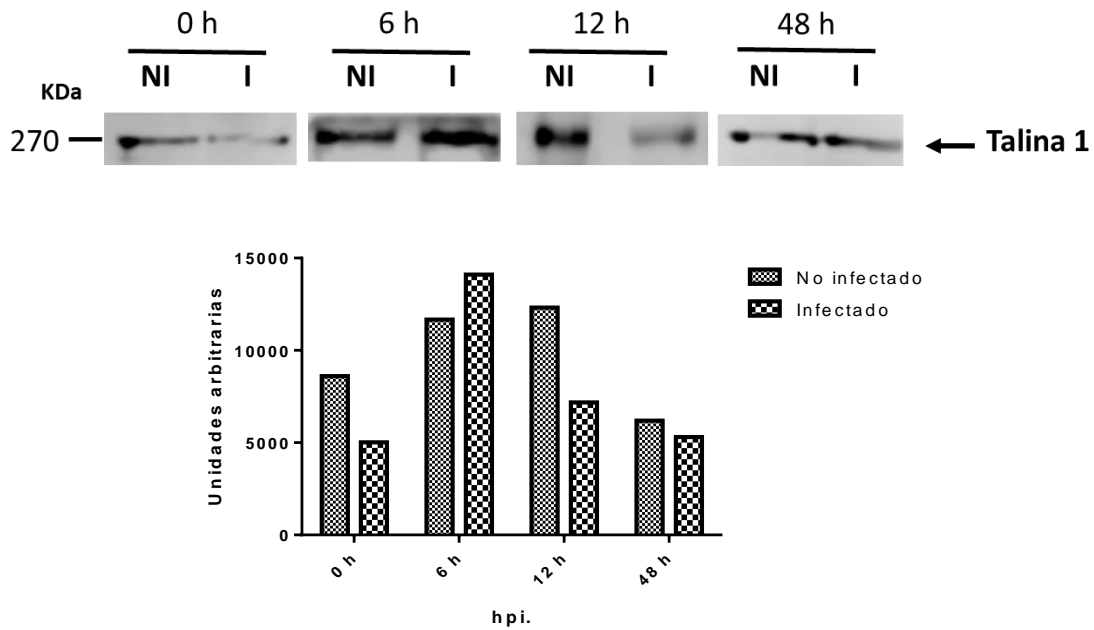
La expresión de TLN1 disminuye en macrófagos infectados por DENV 2.

Nuestros resultados indican que hay disminución de TLN1 en el contenido de los exosomas secretados por células infectadas con DENV 2. En consecuencia, quisimos determinar si esta disminución en los niveles de TLN1 estaba ocurriendo a nivel de RNA mensajero, a nivel de proteína o a nivel de empaquetamiento de TLN1. Para conocer el origen de esta disminución, se realizó una cinética de tiempo de 0, 6, 12, 24 y 48 h post infección (hpi) para determinar la expresión del mensajero y de la proteína de TLN1 en las células infectadas (Figura 5). Encontramos que la infección por el DENV 2 indujo la sobreexpresión del mensajero de Talina 1 a las 6, 24 y 48 h. (Figura 5A). Cuando se determinó la expresión de la proteína Talina 1 mediante *western blot*, se encontró que la infección por el DENV provocó la disminución de TLN1 en las células únicamente a las 12 hpi (Figura 5B). Por otro lado, cuando se determinó el nivel de TLN1 en exosomas secretados por células infectadas y no infectadas, observamos que hay una disminución en el contenido exosomal a las 12 y 48 hpi (Figura 5 C).

A)



B)



C)

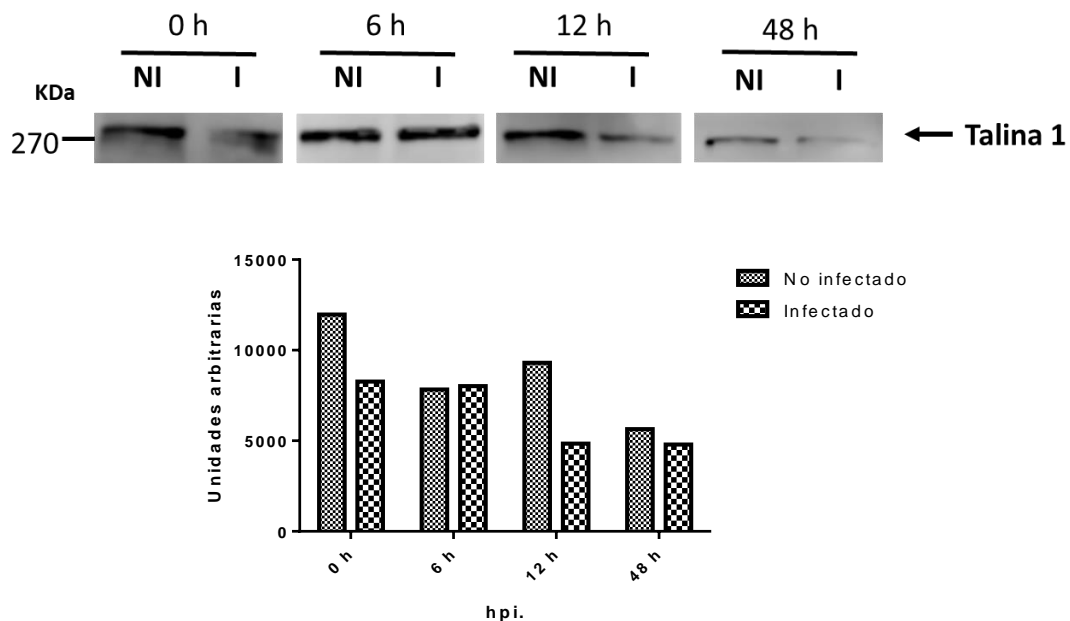


Figura 5: La expresión de TLN1 en macrófagos infectados por DENV 2 se modifica a nivel de mensajero, proteína y contenido exosomal. Se realizó una cinética de hpi. En los macrófagos infectados por DENV 2 y se utilizaron macrófagos no infectados como control. La infección por el DENV 2 aumentó los niveles de expresión del mensajero de TLN1, principalmente a las 6 hpi. **(A)**. Por el contrario, los niveles de proteína disminuyeron a las 12 hpi **(B)**. El empaquetamiento de TLN1 en los exosomas disminuyó considerablemente en los exosomas de macrófagos infectados a las 12 y 48 hpi **(C)**.

Los exosomas secretados por macrófagos U937 DC-SING infectados y no infectados, inhibien la replicación viral.

Para determinar el efecto de los exosomas secretados por células infectadas con el DENV 2, utilizamos exosomas provenientes de macrófagos U937 DC-SIGN para tratar células Vero y posteriormente infectarlas con el DENV 2 (MOI de 1). Se observó que los exosomas de ambas condiciones inhibieron en su totalidad la replicación viral (Figura 6).

A)

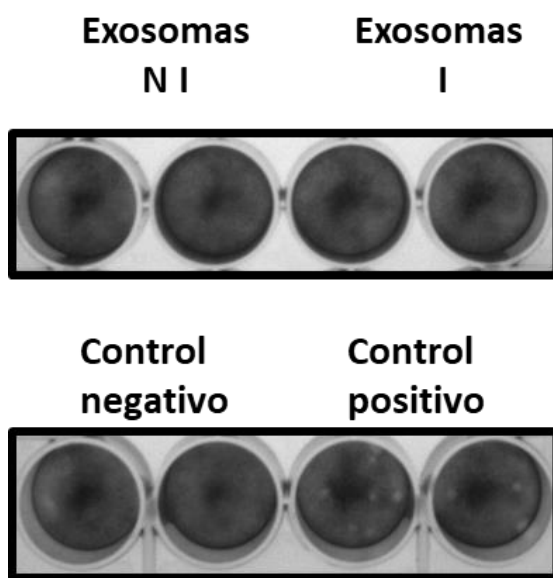


Figura 6: Efecto de los exosomas secretados por macrófagos U937 DC-SING en la replicación viral. Los exosomas secretados por los macrófagos U937 DC-SIGN inhibieron la replicación viral tanto en los no infectados como en los infectados

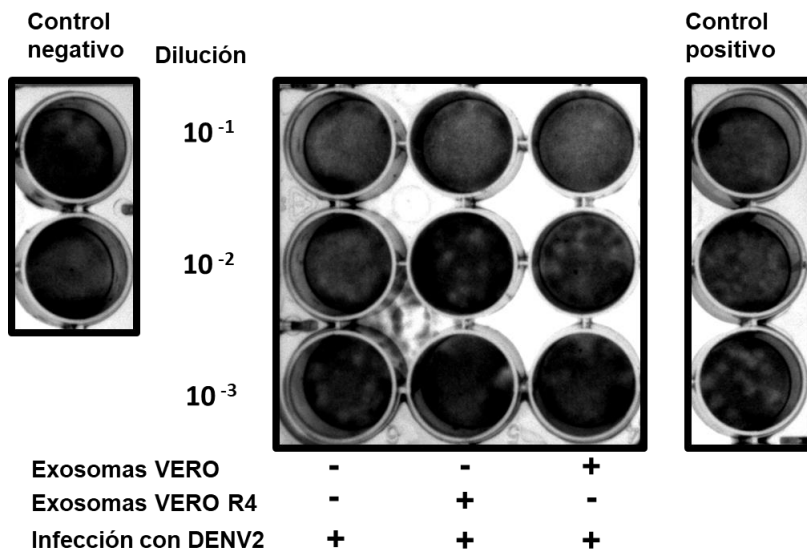
Los exosomas secretados por células expuestas a un replicón del DENV 4 pueden proteger a las células de infecciones por DENV 2

Quisimos comprobar estos resultados utilizando otra línea celular y para ello, utilizamos exosomas de células VERO. Además, utilizamos los exosomas de células VERO que expresan un replicón de DENV 4 (VERO R4), estas últimas células expresan únicamente las proteínas no estructurales del DENV 4 y son un buen modelo para estudiar el efecto de exosomas provenientes de células que han

tenido contacto solo con proteínas del DENV debido a que no hay producción de partículas virales.

Encontramos una reducción de aproximadamente un logaritmo cuando se tratan de manera previa a las células infectadas con exosomas provenientes de células VERO R4, cuando se comparan con células infectadas sin tratamiento con exosomas o tratadas con exosomas provenientes de células VERO sin replicación de DENV (Figura 6 B y C).

A)



B)

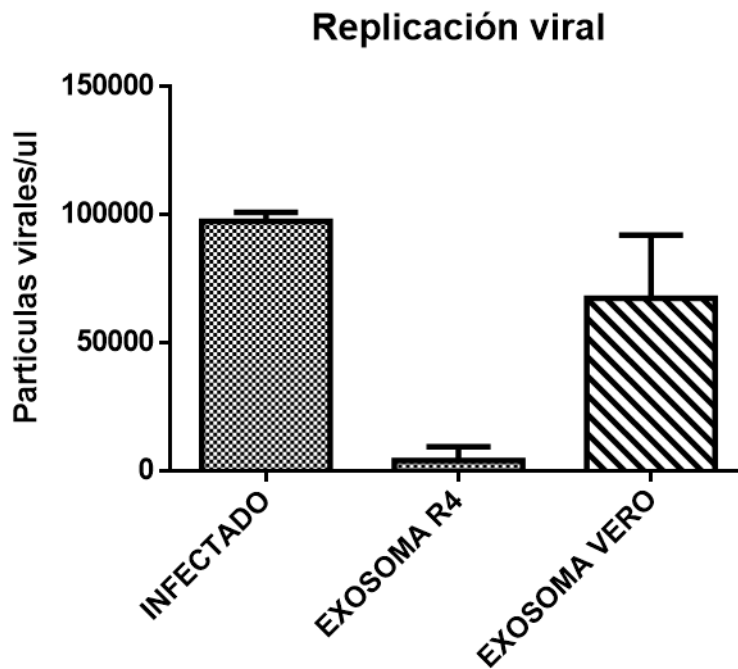


Figura 7: Efecto de los exosomas secretados por células VERO y VERO con el Replicón R4 sobre la tasa de replicación viral. Los exosomas de células VERO que no habían estado en contacto con el DENV 2 no modificaron la tasa de replicación viral significativamente en comparación con los exosomas de VERO R4 que habían tenido contacto con proteínas no estructurales del DENV4 **(A y B)**.

DISCUSIÓN

En las infecciones por DENV, se ha reportado que las vesículas de las células infectadas pueden transportar RNAm de genes estimulados con interferón. Además, las vesículas de las células tratadas con IFN pueden tener un efecto protector contra la infección, inhibiendo la infección en algunas de las células vecinas (Martins *et al.*, 2018). A pesar de haber identificado miRNAs que inhiben la replicación viral a través de los exosomas, no se ha realizado un estudio del perfil proteómico de los exosomas. Es por ello que en este estudio nos enfocamos en determinar el contenido proteico de los exosomas y las proteínas que pudieran tener un papel importante en las infecciones por DENV.

Previamente se había reportado un cambio en el perfil proteómico de la línea celular Huh7 posterior a la infección por DENV 2. Ese reportaron 155 proteínas que cambian su nivel de expresión, sin embargo, no se estudiaron los exosomas de esas células (Pando *et al* 2014). En las imágenes de microscopía observamos que el tamaño de los exosomas liberados de las células infectadas con DENV 2 es mayor que los exosomas secretados por las células no infectadas. Esto probablemente se deba al aumento en la cantidad de proteínas que se empaquetan en los exosomas durante en la infección y a una mayor demanda de espacio para empaquetar el genoma viral. Previamente se ha reportado un comportamiento similar en los exosomas liberados por células de mosquito C6/36 que incrementan su tamaño (hasta un 300%) y su contenido proteico cuando provienen de células que están infectadas con DENV (Ruiz *et al.*, 2019).

Nuestros resultados revelaron que la infección por el DENV 2 induce cambios en la expresión de 130 proteínas exosomales. Las proteínas con mayor sobre expresión en respuesta a la infección por DENV fueron las tubulinas con más de 7 veces. Estos datos coinciden con resultados reportados previamente que indican que en la infección por DENV-2 las proteínas aldolasa, tioredoxina peroxidasa y alfa tubulina incrementan su expresión. Estas proteínas son importantes para el ensamblaje y el transporte de los viriones (Thayan R *et al.*, 2009).

Una de las proteínas del citoesqueleto que disminuyó su expresión fue la proteína TLN1. Se ha reportado que esta proteína disminuye su expresión cuando las células son infectadas con el virus de la hepatitis B. Por lo tanto, se le ha atribuido un papel antiviral debido a que al sobreexpresar esta proteína la tasa de replicación viral disminuye drásticamente (Maarten A *et al.*, 2016). Otro estudio reportó que la proteína Talina 1 en conjunto con Vinculina afectan negativamente la fosforilación de paxilina y limitan la infección retroviral (Craig Brown *et al.*, 2011). En conjunto, nuestros resultados sugieren que TLN1 podría ser degradada en respuesta a la infección por DENV, como sucede con el VHB.

Encontramos que el RNA mensajero de TLN1 aumentó su expresión al as 6 h, 24 h y 48 h pos infección. Estudios previos han demostrado que la infección por el DENV puede modificar el transcriptoma de la célula hospedera (Sessions *et al.*, 2013). Sin embargo, no hay reportes de que el DENV 2 modifique algún factor de transcripción por lo tanto el mecanismo por el cual este virus incrementa el nivel transcripcional de TLN 1 aún no está claro.

Adicionalmente, medimos la proteína TLN1 endógena para determinar si la disminución de ésta proteína en la carga de los exosomas se debía a problemas con el empaquetamiento del contenido de los exosomas o a que pudiera ser degradada por efecto de la infección. Nuestros resultados indican que la proteína TLN1 de los macrófagos infectados disminuyo a las 12 hpi, en comparación con los macrófagos no infectados. Evidencias previas con otros virus como el virus de la hepatitis B, muestran que a través de la proteína X de este virus induce la degradación de la proteína TLN1 vía proteosoma. Nuestros resultados podrían sugerir una regulación de la proteína TLN1 durante la infección por DENV 2 aunque el mecanismo aún no es conocido (Maarten *et al.*, 2016). Recientemente se reportó que en pacientes infectados con DENV, la expresión de TLN1 disminuye en pacientes con cuadros clínicos de FD pero aumenta su expresión en pacientes con cuadros clínicos de FHD (Fragnoud *et al.*, 2015). En el caso del DENV aún no se ha estudiado cuál es el papel de TLN1 durante la infección por este virus y tampoco el mecanismo por el cual, esta proteína disminuye durante la infección.

Suponemos que la infección por el DENV 2, (específicamente alguna de sus proteínas no estructurales) podría estar involucrada en la disminución de la proteína TLN1 en el citoplasma y por lo tanto disminuir su empaquetamiento en los exosomas secretados, ya que estas proteínas pueden tener función de ubiquitin ligasa (Ashour *et al.*, 2009). Sin embargo, se necesitan más experimentos para comprobar esta teoría.

Los resultados de TLN1 exosomal mostraron que hay una reducción en la cantidad de TLN1 en los exosomas de células infectadas a las 12 y 48 horas, estos resultados validan los resultados obtenidos en la cantidad de TLN1 en las células, por lo tanto, podríamos pensar que la reducción de la proteína TLN1 en exosomas no está a nivel de empaquetamiento, sino más bien a nivel celular y que la reducción de esta proteína esté relacionada con la infección viral.

Para evaluar el efecto del contenido de los exosomas de células infectadas por el DENV2, tratamos a las células BHK 21 con exosomas de células VERO y VERO R4, antes de infectarlas; los resultados mostraron que las células que fueron tratadas con exosomas de células VERO que no habían sido expuestas a ningún serotipo de DENV fueron incapaces de reducir la replicación viral del DENV 2. Por otro lado, las células que fueron tratadas con exosomas de VERO R4 redujeron la tasa de replicación viral de manera considerable, esto podría deberse a que las células VERO R4 están en constante interacción con proteínas no estructurales del DENV 4y por ello podrían estar transfiriendo moléculas que bloqueen algún paso del ciclo replicativo del virus o estén induciendo un estado antiviral en las células receptoras a través de exosomas.

La infección por el DENV 2 modificó el perfil proteómico de los exosomas secretados por los macrófagos U937 DC-SING. Mientras que, la expresión de la proteína Talina 1 aumenta a nivel transcripcional a partir de las 6 hpi. Sin embargo, la proteína endógena y la proteína exosomal, disminuyen su expresión a partir de las 12 hpi. Los exosomas de células VERO no infectadas y VERO R4 inhiben parcialmente la replicación viral.

PERSPECTIVAS

Para complementar nuestros resultados y determinar si la proteína TLN1 es la responsable de disminuir la replicación viral, sugerimos sobreexpresar esta proteína en células previo a la infección por DENV.

TLN1 se ha implicado previamente en la replicación de otros virus. TLN1 suprime la replicación de retrovirus, aunque la inhibición no está relacionada con la transcripción viral. En este estudio no hicimos experimentos para demostrar que la reducción en la replicación viral fue debido a la proteína TLN1, por ello es preciso realizar experimentos de sobreexpresión con esta proteína y evaluar la replicación viral. En nuestros experimentos, no demostramos que la degradación de TLN1 observada se deba a una o varias proteínas del DENV por lo que sugerimos hacer inmuno precipitaciones con las proteínas virales para determinar cuál de ellas están interactuando con TLN1.

REFERENCIAS

- Adikari, T., Gomes, L., Wickramasinghe, N., Salimi, M., Wijesiriwardana, N. and Kamaladasa, A. (2016). Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, 184(1), pp.90-100.
- Alhoot, M., Wang, S. and Sekaran, S. (2011). Inhibition of Dengue Virus Entry and Multiplication into Monocytes Using RNA Interference. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(11), p.e1410.
- B. Sodeik, "Mechanisms of viral transport in the cytoplasm," *Trends in Microbiology*, vol. 8, no. 10, pp. 465–472, 2000.
- Brown, C., Morham, S., Walsh, D. and Naghavi, M. (2011). Focal Adhesion Proteins Talin-1 and Vinculin Negatively Affect Paxillin Phosphorylation and Limit Retroviral Infection. *Journal of Molecular Biology*, 410(5), pp.761-777.
- Chahar, H.S., Bao, X., Casola, A., 2015. Exosomes and Their Role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses. 7, 3204–3225.
- Chareonsirisuthigul, T., Kalayanarooj, S., Ubol, S., 2007. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J. Gen. Virol.* 88, 365–375.
- Chen, R. and Vasilakis, N. (2011). Dengue — Quo tu et quo vadis?. *Viruses*, 3(9), pp.1562-1608.
- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.
- Dotson, D., Woodruff, E., Villalta, F. and Dong, X. (2016). Filamin A Is Involved in HIV-1 Vpu-mediated Evasion of Host Restriction by Modulating Tetherin Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), pp.4236-4246.
- Einfeld, A., Kawakami, E., Watanabe, T., Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2011). RAB11A Is Essential for Transport of the Influenza Virus Genome to the Plasma Membrane. *Journal of Virology*, 85(13), pp.6117-6126.
- ExoCarta: Home - Exosome database [WWW Document], n.d. URL <http://www.exocarta.org/> (accessed 1.8.18).
- F. Ang, A. P. Y. Wong, M. M.-L. Ng, and J. J. H. Chu, "Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus," *Virology Journal*, vol. 7, no. 1, article 24, 2010.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martínez, E., Nathan, M.B.,

- Pelegriño, J.L., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R.W., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, S7-16. H
- György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzás, E.I., 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 2667–2688.
 - Haining, A., Lieberthal, T. and del Río Hernández, A. (2016). Talin: a mechanosensitive molecule in health and disease. *The FASEB Journal*, 30(6), pp.2073-2085.
 - Hu, Z., Huang, P., Yan, Y., Zhou, Z., Wang, J. and Wu, G. (2019). Hepatitis B virus X protein related lncRNA WEE2-AS1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), pp.79-86.
 - J.Yang, L. Zou, Z. Hu et al., “Identification and characterization of a 43 kDa actin protein involved in the DENV-2 binding and infection of ECV304 cells,” *Microbes and Infection*, vol. 15, no. 4, pp. 310-318, 2013.
 - Jaworski, E., Narayanan, Afonso, P., Sampey, G., Chung, M., Popratiloff, A., Shrestha, B., Sehgal, M., Jain, P., Vertes, A., Mahieux, R. and Kashanchi, F. (2014). Human T-lymphotropic Virus Type 1-infected Cells Secrete Exosomes That Contain Tax Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), pp.22284-22305.
 - Jessie, K., Fong, M.Y., Devi, S., Lam, S.K., Wong, K.T., 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* 189, 1411–1418.
 - Jones, M., Davidson, A., Hibbert, L., Gruenwald, P., Schlaak, J. and Ball, S. (2005). Dengue Virus Inhibits Alpha Interferon Signaling by Reducing STAT2 Expression. *Journal of Virology*, 79(9), pp.5414-5420.
 - Klann, J., Remedios, K., Kim, S., Metz, P., Lopez, J., Mack, L., Zheng, Y., Ginsberg, M., Petrich, B. and Chang, J. (2017). Talin Plays a Critical Role in the Maintenance of the Regulatory T Cell Pool. *The Journal of Immunology*, 198(12), pp.4639-4651.
 - K. Döhner and B. Sodeik, “The role of the cytoskeleton during viral infection,” *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 285, pp. 67–108, 2004.
 - Kowal, J., Tkach, M. and Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, pp.116-125.
 - L. J. Foster, C. L. De Hoog, and M. Mann, “Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 10, pp. 5813–5818, 2003.
 - Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., Record, M., 2004. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* 380, 161–171.

- Lin YL, Liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RM, et al. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *J Med Virol* 2000;60(4):425–31
- Lu, J., Qu, Y., Liu, Y., Jambusaria, R., Han, Z., Ruthel, G., Freedman, B. and Harty, R. (2013). Host IQGAP1 and Ebola Virus VP40 Interactions Facilitate Virus-Like Particle Egress. *Journal of Virology*, 87(13), pp.7777-7780.
- Martina, B., Koraka, P. and Osterhaus, A. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), pp.564-581.
- Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli-Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., Yen, T., Houghton, M., Pileri, P. and Abrignani, S. (2004). Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *European Journal of Immunology*, 34(10), pp.2834-2842
- Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 2008;11(4):369–77.
- Mou, F., Wills, E., Park, R. and Baines, J. (2008). Effects of Lamin A/C, Lamin B1, and Viral US3 Kinase Activity on Viral Infectivity, Virion Egress, and the Targeting of Herpes Simplex Virus UL34-Encoded Protein to the Inner Nuclear Membrane. *Journal of Virology*, 82(16), pp.8094-8104.
- Pick, R., Begandt, D., Stocker, T., Salvermoser, M., Thome, S., Böttcher, R., Montanez, E., Harrison, U.(2017). Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity. *Blood*, 130(7), pp.847-858.
- R. Kanlaya, S.-N. Pattanakitsakul, S. Sinchaikul, S.-T. Chen, and V. Thongboonkerd, “Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration,” *Journal of Proteome Research*, vol. 8, no. 5, pp. 2551–2562, 2009.
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruyter, P., Willemsen, R., Demmers, J., Stalin Raj, V., Jenster, G., Kwekkeboom, J., Tilanus, H., Haagmans, B., Baumert, T. and van der Laan, L. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), pp.13109-13113.
- Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383.
- Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J. and Smit, J. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), pp.2773-2786.
- S. Lei, Y.-P. Tian, W.-D. Xiao et al., “ROCK is involved in vimentin phosphorylation and rearrangement induced by Dengue Virus pp. 1333–1342, 2013.
- Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W. and Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle

Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLOS Pathogens*, 11(11), p.e1005277.

- Shelton, M., Huang, M., Ali, S., Powell, M. and Bond, V. (2011). Secretion Modification Region-Derived Peptide Disrupts HIV-1 Nef's Interaction with Mortalin and Blocks Virus and Nef Exosome Release. *Journal of Virology*, 86(1), pp.406-419.
- Simmons, C.P., Popper, S., Dolocek, C., Chau, T.N.B., Griffiths, M., Dung, N.T.P., Long, T.H., Hoang, D.M., Chau, N.V., Thao, L.T.T., Hien, T.T., Relman, D.A., Farrar, J., 2007. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 195, 1097–1107.
- SINAVE, Programa de Acción: “Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiología”; Secretaría de Salud, 2009. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-panorama-epidemiologico-de-dengue-90308>
- Stanton, R., Prod'homme, V., Purbhoo, M., Moore, M., Aicheler, R. and Heinzmann, M. (2014). HCMV pUL135 Remodels the Actin Cytoskeleton to Impair Immune Recognition of Infected Cells. *Cell Host & Microbe*, 16(2), pp.201-214.
- Trugilho, M., Hottz, E., Brunoro, G., Teixeira-Ferreira, A., Carvalho, P., Salazar, G., Zimmerman, G., Bozza, F., Bozza, P. and Perales, J. (2017). Platelet proteome reveals novel pathways of platelet activation and platelet-mediated immunoregulation in dengue. *PLOS Pathogens*, 13(5), p.e1006385.
- van de Klundert, M., van den Biggelaar, M., Kootstra, N. and Zaaijer, H. (2016). Hepatitis B Virus Protein X Induces Degradation of Talin-1. *Viruses*, 8(10), p.281.
- X.-F. Xu, Z.-T. Chen, N. Gao, J.-L. Zhang, and J. An, “Myosin Vc, a member of the actin motor family associated with Rab8, is involved in the release of DV2 from HepG2 cells,” *Intervirology*, vol. 52, no. 5, pp. 258–265, 2009.
- Zhu, X., He, Z., Yuan, J., Wen, W., Huang, X., Hu, Y., Lin, C., Pan, J., Li, R., Deng, H., Liao, S., Zhou, R., Wu, J., Li, J. and Li, M. (2014). IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cellular Microbiology*, 17(1), pp.105-118.