



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

***Maestría en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en
Enfermedades Infecciosas.***

TESIS

**“Fosfoproteoma de células THP1 infectadas
con el virus dengue2”**

Alumno: Antonio Humberto Angel Ambrocio

Director de tesis: Dra. Victoria Pando Robles.

El presente trabajo se realizó en el la Unidad de Proteómica del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección de la Dra. Victoria Pando Robles. Este trabajo fue financiado por el proyecto CN-10398 UC-MEXUS/CONACYT. El sustentante agradece la beca otorgada por el CONACYT No. 37521

AGRADECIMIENTOS

Comité asesor

Dra. Rosa Victoria Pando Robles

Dra. Rosa María Del Angel Nuñez. CINVESTAV-IPN

Dr. Jesús Martínez Barnetche. CISEI-INSP

Sinodales

Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez. ENCB- IPN

Dr. Juan Ernesto Ludert León. CINVESTAV – IPN

Dr. Tomas David López Díaz IBT- UNAM

Dr. Humberto Lanz Mendoza CISEI- INSP

INDICE

1.-	ABREVIATURAS	6
2.-	RESUMEN	7
3.-	INTRODUCCION	8
4.-	ANTECEDENTES	10
	4.1 Epidemiología del dengue	10
	4.2 Cuadro clínico	11
	4.3 El virus dengue	12
	4.4 Ciclo de replicación del Virus Dengue	14
	4.5 Patología de la enfermedad.	16
	4.6 Interacción del virus dengue con células humanas	18
	4.7 Fosforilación durante las infecciones virales	24
	4.8 Análisis Genómicos de la relación virus dengue-célula hospedera	25
5.-	JUSTIFICACIÓN	28
6.-	HIPÓTESIS	28
8.-	OBJETIVO.	29
9.-	DISEÑO EXPERIMENTAL	31
10.-	MATERIAL Y MÉTODOS	32

10.1 línea celular	32
10.2 Stock viral	33
10.3 Propagación del virus dengue	33
10.4 Titulación viral	34
10.5 Infección de líneas celulares con virus dengue 2	34
10.6 Detección de porcentaje de infección mediante citometría de flujo	34
10.7 Extracción de proteínas totales	36
10.8 Análisis proteómico	36
10.9 Análisis bioinformático de proteínas obtenidas	40
11.- RESULTADOS	42
12.- DISCUSIÓN	56
13.- CONCLUSIONES	57
14 PERSPECTIVAS	
15.- BIBLIOGRAFÍA	55

ABREVIATURAS

DV	Virus dengue
THP1	Human acute monocytic leukemia cell line
RNA	Acido Ribonúcleico
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
SCD	Síndrome de choque por dengue
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
RE	Retículo endoplásmico
DC SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
I TRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
PMA	miristato, acetato de forbol
Pi	Post infección
SUP	sistema de ubiquitinación-proteasoma
MS	Espectrometría de masas

RESUMEN

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor impacto en salud pública. La OMS reporta alrededor de 50 a 100 millones de casos anualmente, de estos 500,000 son casos severos que requieren hospitalización y se estima un porcentaje de mortalidad del 5% principalmente en niños.

Los virus como parásitos intracelulares obligados necesitan la maquinaria de su célula huésped para su replicación, por lo que han desarrollado diversas estrategias de control y/o evasión de la respuesta celular. Así también, se conoce que las células están expuestas a diversas condiciones de estrés incluidas las infecciones virales, donde las proteínas son las efectoras de la respuesta celular, y uno de los principales mecanismos de regulación de su actividad es la fosforilación.

La investigación proteómica nos permite entender un sistema biológico, mediante el estudio global de proteínas y/o sus modificaciones post-traduccionales. Se conoce que los monocitos/macrófagos son los principales blancos de infección del virus dengue en humanos y son responsables de la diseminación del virus después de la transmisión. Dado lo anterior, en este trabajo, se realizó la identificación del fosfoproteoma de células monocíticas THP-1 infectadas con el virus dengue serotipo 2. Nuestros resultados muestran 45 proteínas que cambian su nivel de fosforilación en respuesta a la infección, de éstas, 41 disminuyen su fosforilación y 4 la aumentan.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales emergentes causadas por flavivirus constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial, debido a su rápida diseminación dependiente de vectores artrópodos y a su gran impacto socioeconómico. Los flavivirus son un género de virus de RNA pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, este grupo de virus incluye al virus de la Fiebre amarilla, al virus dengue (DV), al Virus del Oeste del Nilo y al virus de la encefalitis Japonesa. De estos, el virus dengue se considera como el arbovirus de mayor importancia a nivel salud y de mayor diseminación en el planeta.

Se estima que dos quintas partes de la población humana viven en riesgo de infección, principalmente en las áreas tropicales y sub-tropicales. Los DV circulan en la naturaleza como una población de cuatro diferentes serotipos (DV1-4), cada uno con múltiples genotipos y variantes. Los DV son transmitidos al hombre mediante la picadura de las hembras de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus*, infectados con alguno de estos serotipos^{1,2}

El tropismo celular del DV es amplio, está adaptado a desarrollarse en dos hospederos filogenéticamente diferentes, el hombre y los mosquitos del género *Aedes*. El blanco principal de la infección del DV en humanos son células dendríticas, monocitos y macrófagos^{3,4} además de células de hígado, pulmón, nódulos linfáticos, timo, cerebro y piel.^{5,6,7,8}

La replicación del DV puede autolimitarse de manera efectiva, después de un corto período de viremia en la mayoría de los individuos. Sin embargo, no se conocen del todo, qué factores del huésped inducidos por la infección están involucrados en la regulación de la replicación viral. Así también, no es claro, que factores contribuyen a la patogénesis y a la progresión de la enfermedad. Se piensa, que la gravedad de la enfermedad es determinada por las interacciones entre el virus, la respuesta inmune y factores genéticos del hospedero, que incluyen magnitud y duración de la replicación viral, expresión de citocinas (especialmente Tumor Necrosis Factor-TNF), al igual que activación y proliferación de células que participan en la respuesta inmune⁹.

La fiebre por dengue (FD) es una enfermedad multifactorial compleja que involucra diversos procesos biológicos, y es determinada por una serie de interacciones entre el virus, la respuesta inmune y otros factores genéticos del hospedero. No existe consenso sobre el mecanismo por el cual, la infección del hombre con el virus dengue causa Fiebre hemorrágica por dengue (FHD)/Síndrome de choque por dengue (SCD). La ausencia de un modelo animal de estudio particularmente de las formas graves de la enfermedad ha limitado el conocimiento de la fisiopatología de la infección por dengue.

Para tratar de entender la interacción del virus dengue con su célula hospedera, en este trabajo, se usaron metodologías al estado del arte de la investigación proteómica, para evaluar cambios en el estado de fosforilación de las proteínas celulares de los monocitos infectados y no infectados con el virus dengue 2.

ANTECEDENTES

Epidemiología del dengue

Hasta el siglo XIX la FD fue considerada como una enfermedad esporádica, sin embargo, hoy en día es la enfermedad viral transmitida por mosquitos vectores más importante en el mundo. La OMS estima más de 50 millones de infecciones con DV a nivel mundial, con 500, 000 casos de FDH y 22,000 muertes, principalmente en niños. La FD y FHD están presentes en áreas urbanas y suburbanas de las regiones tropicales del mundo¹⁰.

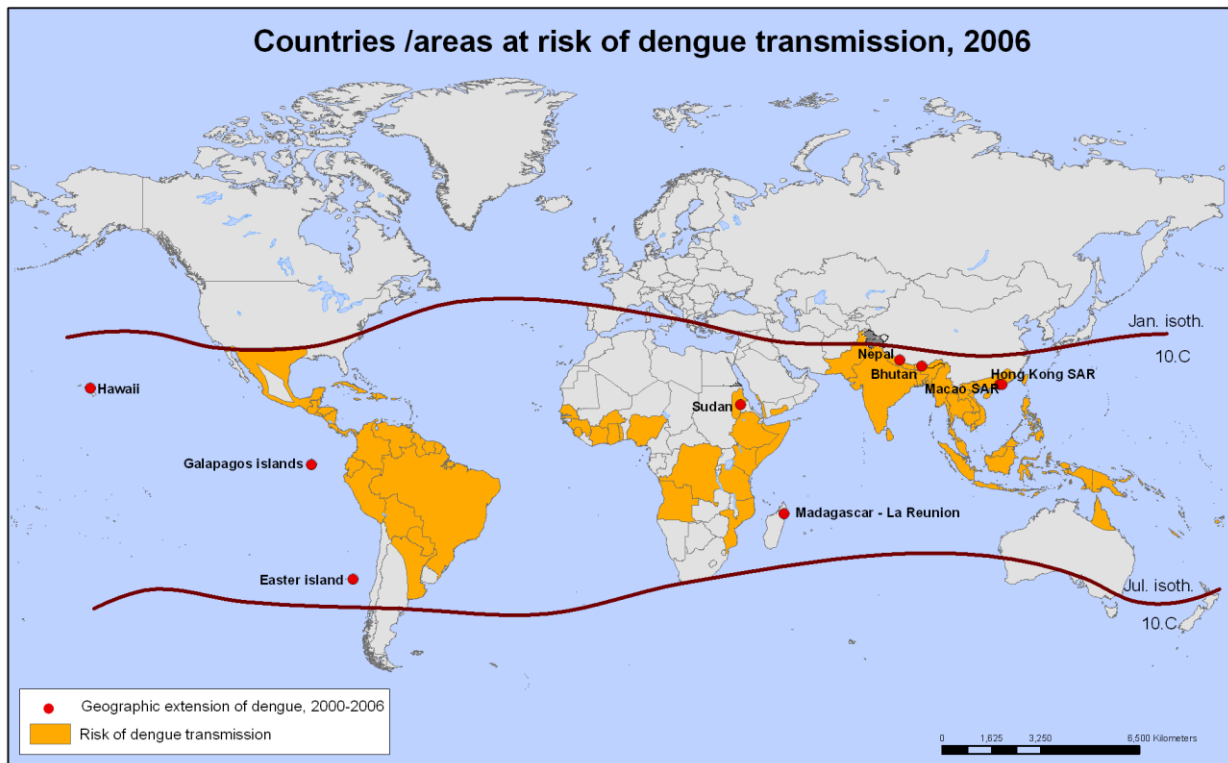


Figura 1. Areas en riesgo de transmisión. Las regiones tropicales son las zonas con mayor riesgo de transmisión debido a una mayor presencia del vector en estas áreas. Fuente: Organización Mundial de la Salud 2006¹¹

La combinación de factores tales como un rápido crecimiento poblacional, migración, infraestructura urbana inadecuada, incremento en el volumen de basura, así como contenedores de plástico y otros artículos abandonados proveen hábitats para el desarrollo de las larvas de *A. aegypti* en áreas urbanas, produciendo así condiciones epidemiológicas en países en vías de desarrollo, en trópicos y subtrópicos que favorecen la transmisión viral por el vector¹¹. (Figura 1)

La Organización Panamericana de la Salud reporta que México ocupa el cuarto lugar en incidencia en América¹², por su parte el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades durante el 2011 reportó 10,970 casos de fiebre por dengue y 4608 casos de fiebre hemorrágica por dengue con un total de 36 defunciones, lo que representa una letalidad de 0.78 por cada 100 habitantes.¹³

Cuadro clínico

La infección del hombre con el virus dengue puede cursar en forma asintomática o expresarse en un amplio espectro de manifestaciones clínicas

Después de un periodo de incubación de 2 a 7 días en general el paciente suele experimentar fiebre de comienzo brusco, cefalea, dolor retro orbitario, dolores de espalda, además de mialgias intensas. Durante el primer día de aparición de los síntomas suele haber un exantema maculopapuloso, así como adenopatías, vesículas en el paladar e inyección conjuntival. La enfermedad puede durar una semana y habitualmente existen otros síntomas, como anorexia, náuseas o vómitos, e intensa hipersensibilidad cutánea¹⁵.

La FHD y SCD son las formas más graves de la enfermedad. Estas tienen como característica el aumento de la permeabilidad vascular que puede llevar a una hemoconcentración y choque hipovolémico¹⁵.

La FHD se diagnostica detectando la tendencia hemorrágica o la existencia de hemorragias manifiestas¹⁴, sin que haya procesos subyacentes. El SCD es mucho más grave, y es el resultado del aumento de la permeabilidad vascular que provoca el choque. En FHD y SCD se presenta agitación, letargo, trombocitopenia y hemoconcentración, 2 a 5 días después del comienzo típico de la fiebre del dengue. En los casos más graves es evidente un shock manifiesto, con baja presión arterial, cianosis, hepatomegalia, derrames pleurales, ascitis, equimosis y hemorragias digestivas¹⁵.

El tratamiento clínico de las infecciones por DV es sintomático y de soporte, no existe ninguna vacuna aceptada, ni una terapia antiviral específica para prevenir o contrarrestar la infección¹⁵.

El virus dengue

Durante la infección de los virus a su célula hospedera, ocurren una serie de eventos que los virólogos han denominado “ciclo de replicación”. Este involucra, la unión-entrada del virus a la célula, la replicación de su genoma, la síntesis y modificación de sus proteínas, el ensamblaje de la partícula viral y por último, la liberación de la progenie al medio externo. El resultado de la coevolución del virus y su hospedero, es su sobrevivencia. A nivel molecular, esto se traduce en el desarrollo de diversas estrategias de control/modulación de los procesos celulares

de su hospedero.

El DV presenta un genoma es de 11 kb que está conformado por RNA de cadena sencilla de polaridad positiva. Presenta CAP (m^7GpppX) en el extremo 5' pero carece de cola poliadenilada (poli A) en el extremo 3'.

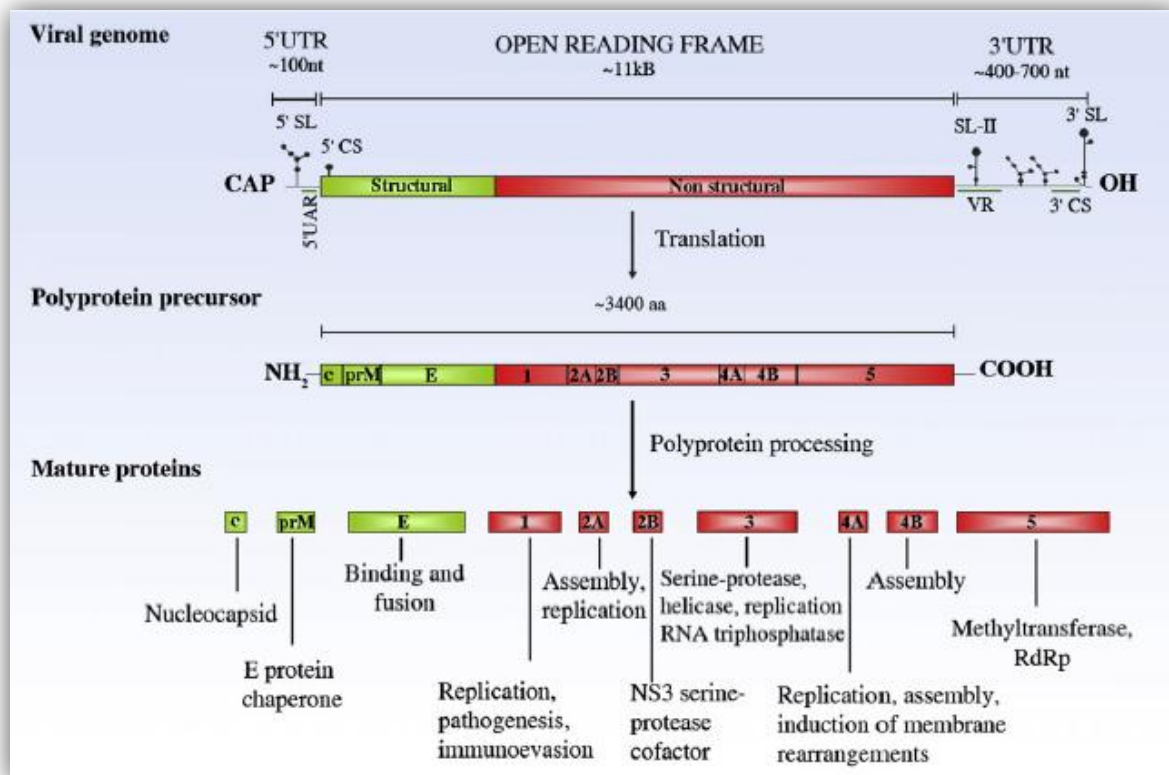


Figura 2. Genoma y Proteoma del Virus Dengue¹⁶ El genoma del DV codifica para 3 proteínas estructurales (C, prM y E) que conforman la partícula viral y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que están involucradas en la replicación, ensamblaje del virión así como la modulación de la respuesta celular.

Su genoma codifica para tres proteínas estructurales que son: la proteína de la cápside (C), premembrana (prM) y envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5). (Figura 2)

Las proteínas estructurales forman la partícula viral, (figura 3); mientras las no estructurales participan en la replicación, ensamblaje del virión y modulación de la

respuesta celular. Los DV son partículas icosaédricas de 50 nm de diámetro con una capa lipídica derivada del hospedero revistiendo una nucleocápside de proteína C que rodea al RNA viral^{17,18}.

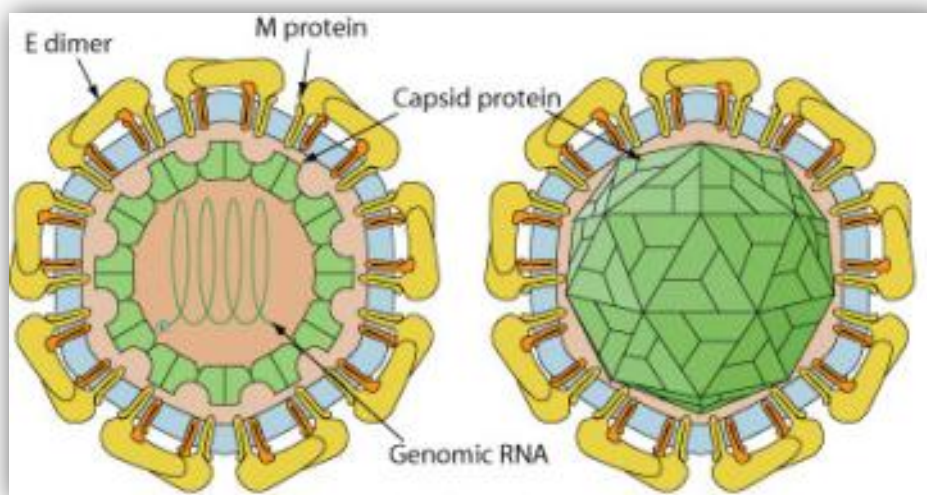


Figura 3. Proteínas estructurales ensambladas¹⁹. En la figura se muestra un corte transversal de la partícula viral ensamblada y su forma icosaédrica.

Ciclo de replicación del Virus Dengue

La entrada de los DV al citoplasma celular se realiza por endocitosis mediada por receptor. Muchas moléculas han sido propuestas como posibles receptores, pero la interacción mejor descrita es la que se lleva a cabo, en células dendríticas, con la lectina DC-SIGN como molécula responsable de la unión. Otros ejemplos descritos son: La proteína clec5a, la cual participa en la unión del virus a la membrana celular, aunque no es requerida para la entrada del virus en el citoplasma, la interacción de esta proteína con el virión, dispara una cascada de señales que lleva a la transcripción de citocinas proinflamatorias, las cuales se relacionan con la patogenia de los cuadros severos de la enfermedad^{20,21}.

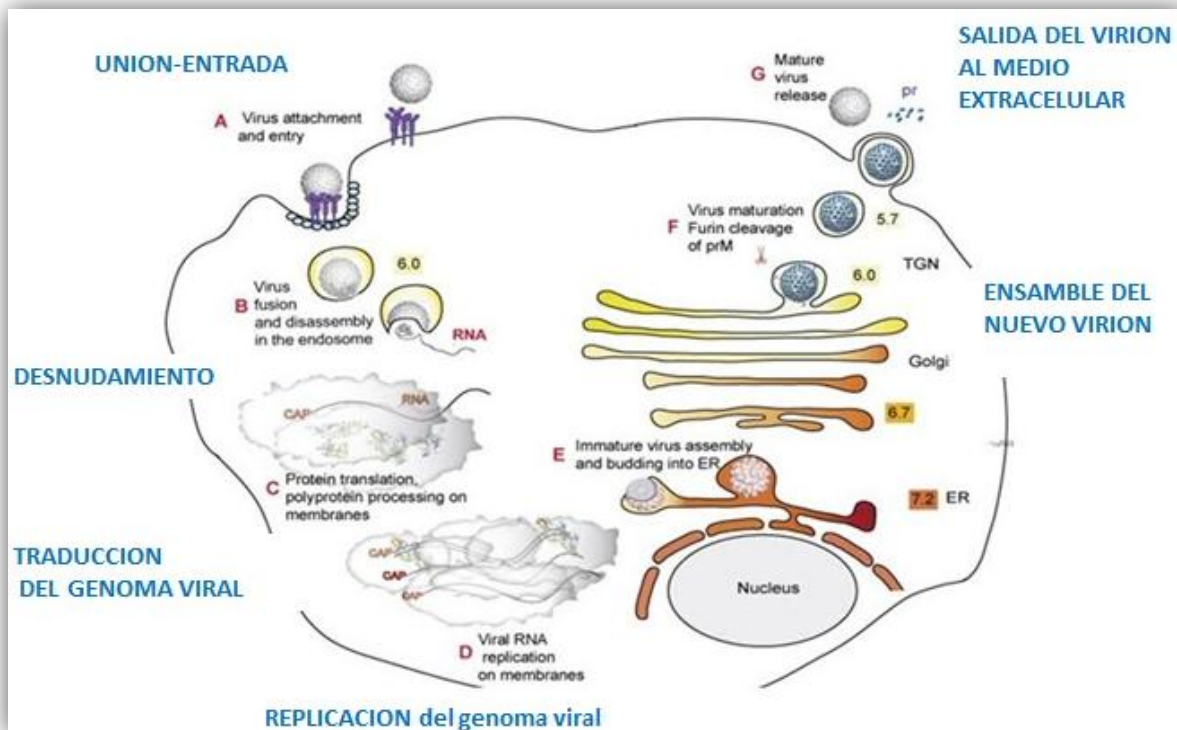


Figura 4. Ciclo de replicación del DV. El DV ingresa a la célula mediante endocitosis mediada por receptor, la traducción y replicación ocurre en estructuras membranosas relacionadas con RE, luego, las partículas recién ensambladas son transportadas a Golgi, donde termina su maduración y son expulsadas al medio extracelular por exocitosis.

El pH ácido de los endosomas provoca cambios conformacionales en la glicoproteína E, lo cual induce la fusión de membranas viral y endosomal permitiendo su interiorización²². Una vez dentro de la célula el genoma viral debe traducirse para generar la replicasa de RNA viral para establecer una infección productiva.

La traducción y replicación de virus de cadena positiva ocurre en asociación con estructuras membranosas intracelulares relacionadas con el retículo endoplásmico^{23,24}. Cuando la nucleocápside entra al citoplasma, el genoma viral es liberado, y traducido a una poliproteína la cual sufre procesamiento co y postraduccion, por proteasas del hospedero y virales para producir las proteínas

individuales para la replicación y empaquetamiento.

La replicación inicia con la síntesis de la cadena negativa, que sirve como molde para la producción de múltiples copias de la RNA de cadena positiva²⁵. Tanto la replicación como el ensamblaje ocurren en las membranas del retículo endoplásmico. (Figura 4). Las partículas recién ensambladas son transportadas hacia la red trans Golgi y en este compartimiento la proteína E experimenta cambios conformacionales y la proteína prM es procesada proteolíticamente por la furina celular en pr y M. El péptido pr permanece asociado con la proteína E hasta que el virión maduro es liberado de la célula, mientras la proteína M se asocia con la membrana viral. (Figura 5). Finalmente, la progenie viral es liberada al medio externo por exocitosis^{17,18}.

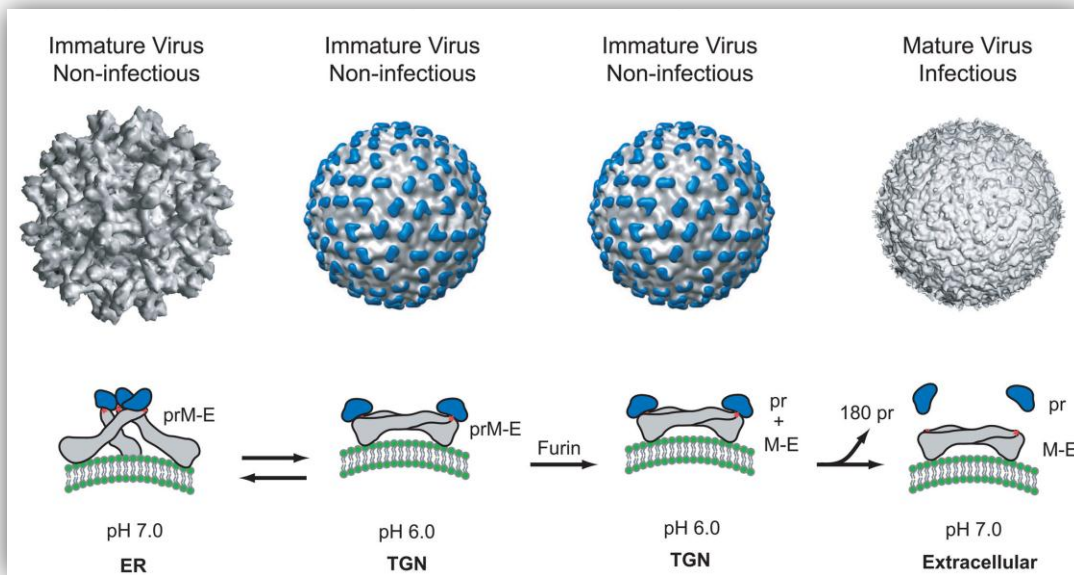


Figura 5. Maduración de la partícula viral. ²⁶ En la red trans Golgi la proteína prM es procesada proteolíticamente por una furina celular en pr y M. El péptido pr permanece unido a la proteína E hasta que el virión es liberado.

Patología de la enfermedad

Aún hoy en día, la patogénesis del dengue es pobremente entendida, principalmente debido a la falta de un modelo animal de estudio, ya que sólo los humanos desarrollan las formas graves de la enfermedad, donde la investigación se ha limitado a estudios que incluyen pacientes. Sin embargo, en las dos últimas décadas se han tenido importantes avances en la biología del DV, que incluyen, las determinaciones estructurales del virión y de las proteínas virales, la caracterización de los mecanismos de replicación y traducción viral, así como algunos factores del hospedero que facilitan la infección viral.

Aunque no es posible establecer una correlación clara con la severidad de la enfermedad entre un serotipo o genotipo del DV, existe evidencia que ciertos genotipos de DV2 y DV3 están asociados con FHD.^{27, 28} Por otra parte estudios epidemiológicos han demostrado que existen factores genéticos de riesgo en el hospedero, entre los cuales se encuentran: alelos HLA clase I, polimorfismos en el factor de necrosis tumoral (TNF alfa), receptor de la vitamina D entre otros.²⁹

Otro punto a resaltar, es el tropismo tisular y celular que tiene el virus dengue, lo cual le da muchas ventajas para su diseminación por el organismo.

Proceso de Infección

El humano es infectado con el virus dengue durante la alimentación hematófaga del mosquito Aedes hembra infectado. El DV es depositado en la piel, llegando a la epidermis y dermis, donde infecta células inmaduras de Langerhans (células dendríticas de la epidermis)³⁰ Las células infectadas migran hacia los nodos

linfáticos, donde los monocitos y macrófagos se convierten en blancos de la infección. Consecuentemente, la infección es amplificada y los virus se diseminan a través del sistema linfático. En la viremia primaria distintos tipos de células del linaje mononuclear son infectados, incluyendo los monocitos³¹, células dendríticas y macrófagos esplénicos y hepáticos.

La infección con un serotipo de DV proporciona inmunidad a el mismo serotipo, la respuesta inmune proporciona protección contra otros serotipos solamente durante los primeros meses después de adquirida la infección³²

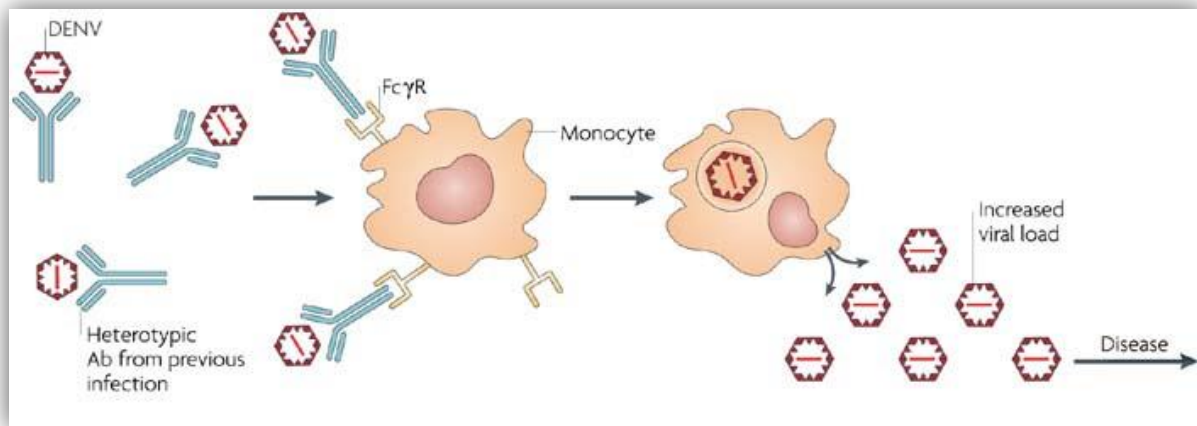


Figura 6 Amplificación mediada por anticuerpos³³. La formación de complejos virus anticuerpos, interaccionan con el recetor Fc, dirigen a los virus a las células diana originando una infección potenciada.

Debido a esto, una de las explicaciones del aumento de la severidad en una segunda infección es la teoría de amplificación mediada por anticuerpos. Esta propone que una infección previa causada por un serotipo heterólogo del virus dengue puede inducir a la formación de complejos virus-anticuerpos que se unen a la superficie del virión y tras su interacción con el receptor, Fc dirigen a los virus dengue hacia células diana, originando una infección potenciada³⁴ (Figura 6).

El huésped está también sensibilizado ante una respuesta secundaria de anticuerpos cuando se liberan los antígenos virales y la formación de inmunocomplejos induce la activación de la vía clásica de complemento, aumentando los efectos inflamatorios.

Interacción del virus dengue con células humanas

El virus dengue es reconocido en las células de mamífero por los receptores tipo Toll y las helicasas tipo DexD/h box, activando así la respuesta de interferón tipo I.

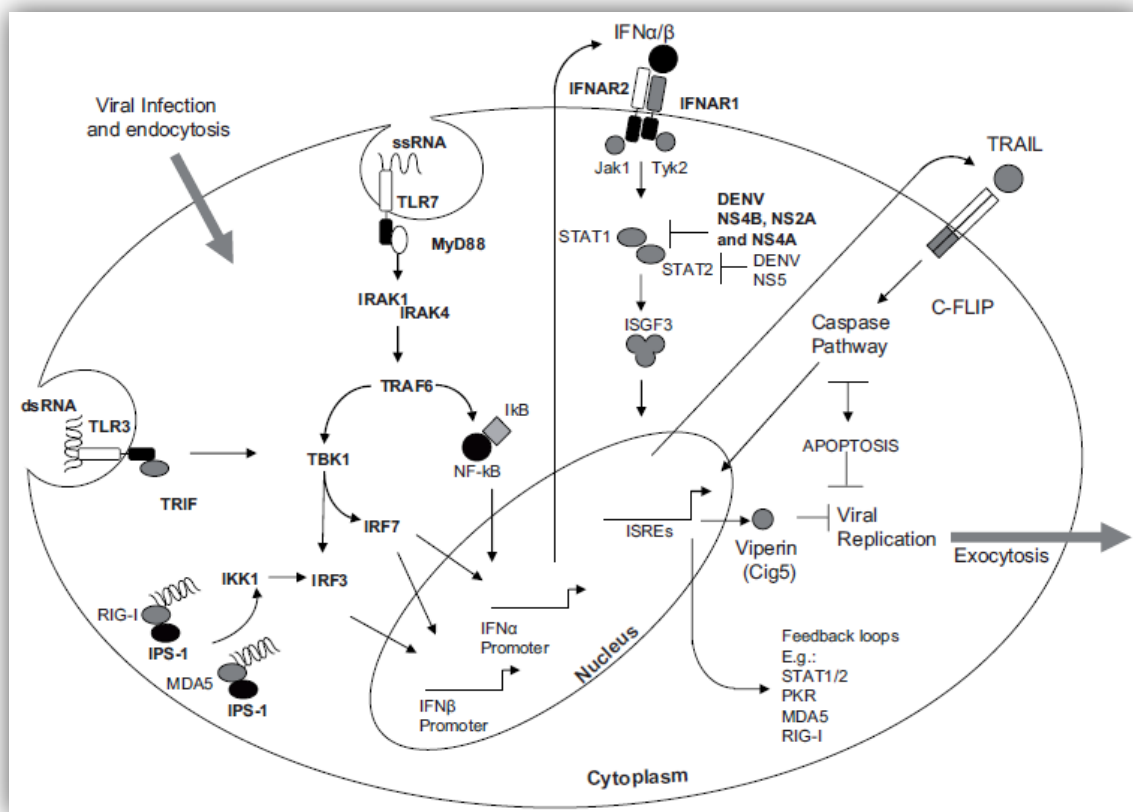


Figura 7. Modulación de IFN α/β en la célula hospedera³⁶. El reconocimiento del DV ocurre en los compartimentos endosomales, durante la infección disparando de NFκB, IFNα/β, IR7 e IR3 y la activación de IFNα e IFNβ. IFNα/β activa al receptor IFNα/β y a la vía JAK/STAT, la cuál induce la fosforilación y dimerización de STAT1/2 y la formación de el factor ISGF3, el cuál se trasloca al núcleo y activa ISREs. Las proteínas no estructurales NS4B, NS2A y NS4B bloquean la fosforilación de STAT1, NS5 por su parte se une y facilita la degradación de STAT2. Estas interacciones bloquean parte de la vía JAK/STAT y reducen la activación de ISREs.

El interferón actúa en las células no infectadas estimulando la señalización JAK/STAT, la cual promueve la activación de los genes de respuesta a interferón por medio de los cuales las células establecen una respuesta antiviral. Aunque, existe evidencia reciente, que el virus tiene mecanismos por medio de los cuales debilita la señalización de interferón, La expresión de la proteína NS5 de DV es suficiente para inhibir la señalización del IFN alfa³⁵.

Las proteínas no estructurales NS4, NS2 y NS5 del virus dengue expresadas por separado o en replicones bloquean la fosforilación y disminuyen la expresión de los principales componentes de la vía JAK/STAT, causando una reducción significativa de la expresión de los genes de respuesta a interferón.³⁶ (figura 7)

Por otro lado, se sabe que en el curso de una infección productiva, los flavivirus inducen proliferación e hipertrofia de las membranas del retículo endoplásmico de su célula huésped. Adicionalmente, la biogénesis de las glicoproteínas virales y la acumulación de proteínas mal plegadas, da lugar a una respuesta adaptativa de la célula que se conoce como Respuesta a Proteínas Mal Plegadas. (UPR unfold protein response). Existen tres sensores de estrés en el RE, las proteínas transmembranales ATF6, IRE1 y PERK. En condiciones normales, estas proteínas se encuentran unidas a BIP (GRP78), la cual se localiza en el lumen del RE.

Cuando se da una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, BIP se une a las proteínas defectuosas y libera a los sensores de estrés. Se ha visto que la infección por dengue induce la activación de UPR y la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2alfa, que tiene como consecuencia la inhibición de la

traducción^{37,38}. Sin embargo, este fenómeno fue descrito a 48 y 72 horas post-infección, tiempo en el cual ya se dieron varios ciclos de replicación, se ha estimado que el tiempo que pasa entre la entrada del virus y la salida del nuevo virión es de 20 horas. Además durante la infección con el virus dengue no se inhibe la síntesis de proteínas, por lo que se deduce que el virus debe haber desarrollado alguna estrategia que le permite controlar la respuesta UPR³⁹.

La proteína E contiene dos sitios de N-glicosilación Asn-67 y Asn-153. Ya que la glicosilación es muy importante en el ciclo replicativo viral, se ha estudiado el efecto de estos dos residuos en la infección del DV en células de mamíferos y células de insecto. Los resultados mostraron que los virus que perdieron el residuo Asn-67 fueron capaces de infectar las células de mamíferos, traducir y replicar el genoma viral, sin embargo no se obtuvo progenie. Los virus que perdieron el residuo Asn-153 mostraron una reducción de la infectividad. Sin embargo, en células de insectos los virus que perdieron uno o dos residuos se comportaron igual que el control, es decir mantuvieron los mismos niveles de replicación⁴⁰. Recientemente, se describió que la glicoproteína viral E interactúa con la chaperona BIP en el RE, y con las proteínas calnexina y calreticulina. Además, se ha reportado que la inhibición de estas proteínas disminuye drásticamente la infección del DV⁴¹. Estos resultados sugieren, que el virus dengue utiliza diferentes estrategias diferenciales de control de la maquinaria celular de acuerdo al hospedero donde se replique.

Otro estudio muestra que la infección por DV en células dendríticas, monocitos, linfocitos B y células endoteliales induce la sobre-expresión de TRAIL (Tumor

necrosis factor-related apoptosis-inducing Ligand) a nivel de RNA y a nivel de proteína. TRAIL es un inductor de apoptosis, sin embargo, cuando se agregó TRAIL recombinante a los cultivos de células infectadas con dengue, se inhibe la replicación viral y no se induce apoptosis. Estos datos sugieren que TRAIL inhibe la replicación independiente de apoptosis⁴².

Fosforilación durante las infecciones virales

Los sistemas de transducción de señales, coordinan la información celular compleja para regular diferentes acontecimientos biológicos, tales como proliferación y diferenciación celular, mediante la fosforilación/defosforilación de proteínas. Este evento es catalizado por enzimas proteína cinasas, las cuales transfieren un grupo fosfato desde el ATP a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina, treonina o tirosina de la proteína y esta fosforilación puede ser revertida por las enzimas proteína fosfatasas, las cuales catalizan la hidrólisis de un grupo fosfato de un aminoácido fosforilado. La acción combinada de las cinasas y las fosfatasas media la fosforilación reversible de muchas proteínas celulares. La acción secuencial de varias proteínas cinasas puede transmitir una señal recibida en la superficie celular a una proteína diana en el interior de la célula, cuyo efecto final impacta la expresión de genes y se refleja en cambios celulares en respuesta a diversos estímulos ambientales⁴³. En el caso de una infección por DV estos cambios podrían detener o favorecer la infección.

Los cambios en la fosforilación de proteínas son utilizados por los agentes infecciosos, para explotar las vías de señalización de su célula hospedera^{44,45}. En

el caso de los flavivirus se ha reportado, que en infecciones de la microglia con el Virus del Oeste del Nilo, se produce un aumento de la fosforilación en p38 MAP, ERK y JNK⁴⁶. Para el caso del virus dengue, se conoce que la infección induce la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2alfa^{36,37}. Cabe resaltar que la fosforilación está involucrada en la modulación de la respuesta inmune innata por el virus dengue. Se conoce que las proteínas virales no estructurales NS4B, NS2A y NS4A bloquean la fosforilación de STAT1.⁴⁷ Así también, la proteína viral NS5 se une y facilita la degradación de STAT2⁴⁸ estas interacciones inhiben/disminuyen la respuesta celular antiviral por IFN, como se observa en la figura 7.

Análisis Genómicos de la relación virus dengue-célula hospedera

Con el advenimiento de la tecnología genómica, se pueden conocer los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a la infección a nivel RNA (transcriptoma) o a nivel de proteínas (proteoma). Durante la infección de DV, se han reportado cambios en la expresión de genes a nivel transcripcional, tanto en líneas celulares como en pacientes. Estos resultados muestran, que la célula infectada responde a la infección activando una respuesta inmune NF-kappa, interferón de tipo I y la vía ubiquitina para activación del proteosoma^{49,50,51,52,53,54}. Adicionalmente, se ha reportado el análisis de distintos proteomas en respuesta a la infección con el DV, de la línea celular Hep2, células endoteliales y en suero de pacientes^{55,56,57}. Estos trabajos mencionan entre 15 y 30 proteínas que cambian su patrón de expresión en respuesta a la infección, cuya función está relacionada con la respuesta de interferón tipo I y con la activación del proteosoma.

Para la biología de sistemas, la capacidad de cuantificar las proteínas es una ventaja clave del análisis proteómico. El objetivo general de estas mediciones relativas es obtener una instantánea de las concentraciones proteicas asociadas a los diferentes estados fisiológicos.

La proteómica cuantitativa, se realiza básicamente por dos procedimientos: 1) el marcaje de proteínas con fluoróforos Cy, seguido de la separación y análisis de geles con el sistema DIGE (del inglés Difference Gel Electrophoresis), finalizando con la identificación de proteínas por EM, y 2) mediante la incorporación de isótopos estables en cultivos celulares (marcaje metabólico) o reactivos químicos con diferentes isótopos que marcan las proteínas para su posterior análisis por espectrometría de masas. Estas técnicas son: ICAT (del inglés isotope-coded affinity tags), SILAC (del inglés stable isotope labeling with amino acids in cell cultura), iTRAQ (del inglés isobaric tags for relative and absolute quantification) y AQUA (del inglés absolute quantification).

La fosfoproteómica basada en espectrometría de masas es una metodología que permite el análisis global de la fosforilación de proteínas y de señalización molecular en las células⁵⁸. El genoma humano contiene alrededor de 500 genes para proteínas quinasa, que constituyen aproximadamente el 2% del total. Se estima, que alrededor del 30% de todas las proteínas pueden ser modificadas por la actividad de una cinasa⁵⁹. Hasta hace unos años, la fosforilación más frecuentemente encontrada correspondía a la tirosina. Sin embargo, con el advenimiento de la tecnología proteómica, se ha visto que las fosforilaciones en serinas y treoninas son más abundantes, aunque son más lábiles. La fosforilación

es la modificación postraducciona de más frecuente e importante que ocurre en las células de mamífero.

El aislamiento de fosfopéptidos y su análisis por espectrometría de masas sigue siendo un desafío para la investigación proteómica, principalmente a causa de la baja estequiometría de la fosforilación, de la diversidad de los péptidos que pueden ser fosforilados, de la dinámica de la fosforilación y de la estabilidad del estado de fosforilación. Existen tres estrategias para el enriquecimiento de fosfopéptidos: captura por afinidad a anticuerpos, modificación química de fosfoaminoácidos y la captura por afinidad a iones metálicos. Los métodos basados en anticuerpos, se utilizan principalmente para el aislamiento selectivo de proteínas o péptidos que contienen fosfotirosina. Los métodos químicos, involucran la β -eliminación de fosfatos de fosfoserina y fosfotreonina o la formación de fosforamidatos por reacción con aminas para inmovilizar selectivamente fosfopéptidos. Las técnicas de captura por afinidad a iones metálicos comprende la cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) con Fe (III) o Ga (III), también se utilizan óxido de metales (TiO_2 y ZrO_2) para la unión selectiva de péptidos fosforilados⁶⁰.

Con el desarrollo tecnológico de los últimos años, se han podido elucidar un número importante de fosfoproteomas. Combinando las metodologías de proteómica cuantitativa y de enriquecimiento de fosfopéptidos se han aislado e identificado alrededor de 1000 fosfopéptidos en diferentes modelos celulares^{61,62}

Los estudios a nivel transcripcional han contribuido a un mejor entendimiento de la interacción del virus dengue y su célula hospedera. Sin embargo, dado que las efectoras de la función celular son las proteínas y sus modificaciones postraduccionales, en este trabajo se propone analizar el fosfoproteoma de las células THP-1 infectadas con el virus dengue mediante la tecnología proteómica. Combinando dos metodologías, el enriquecimiento de fosfopéptidos mediante columnas de afinidad cargadas con dióxido de titanio y el marcaje peptídico con etiquetas de masa conocida ITRAQ, para la cuantificación relativa de los fosfopéptidos aislados de células THP1 infectadas y no infectadas con el virus dengue^{61, 62}.

JUSTIFICACIÓN

El dengue es una enfermedad multifactorial compleja, que involucra alteraciones de distintos procesos biológicos, y que está determinada por una serie de interacciones entre el virus y el hospedero. El genoma del virus dengue codifica para 10 proteínas y con ellas debe controlar/modular la maquinaria celular del hospedero para llevar a cabo su ciclo de replicación.

Los monocitos son el principal blanco de infección del virus dengue y se ha propuesto que tienen un rol fundamental en el desencadenamiento de las formas severas de la enfermedad. Por ello, consideramos que los monocitos son un modelo adecuado para la identificación *in vitro* de proteínas celulares que cambian su patrón de fosforilación en respuesta a la infección con el virus dengue. El conocimiento de las vías de transducción de señales que son afectadas durante la infección viral contribuirá a un mejor entendimiento de las bases moleculares de la patogénesis de la enfermedad.

HIPOTESIS

La infección de monocitos con el virus dengue induce una respuesta celular, que se puede observar a nivel de cambios en los patrones de fosforilación de las proteínas celulares.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las proteínas celulares que cambian su nivel de fosforilación en células THP-1 infectadas con el virus dengue serotipo 2.

Objetivos específicos

- 1) Establecer el tiempo post-infección en el cual se detecta el mayor porcentaje de células infectadas.
- 2) Identificar en forma cuantitativa el patrón de expresión de proteínas fosforiladas en células infectadas y no infectadas con el virus dengue.
- 3) Realizar el análisis bioinformático de las proteínas identificadas

Para cumplir con el objetivo general y los objetivos específicos se proponen los siguientes objetivos metodológicos:

Objetivos Metodológicos

- 1) Realizar un curso temporal de infección con el virus dengue 2 en células THP1 y determinar el porcentaje de infección por citometría de flujo.
- 2) Realizar el análisis proteómico cuantitativo usando el sistema ITRAQ y Cromatografía de afinidad para el enriquecimiento de fosfopéptidos.
- 3) Usar bases de datos para el análisis de interacciones de proteínas: Uniprot, PANTHER y STRING .

Diseño experimental 1: Cuantificación del porcentaje de células infectadas

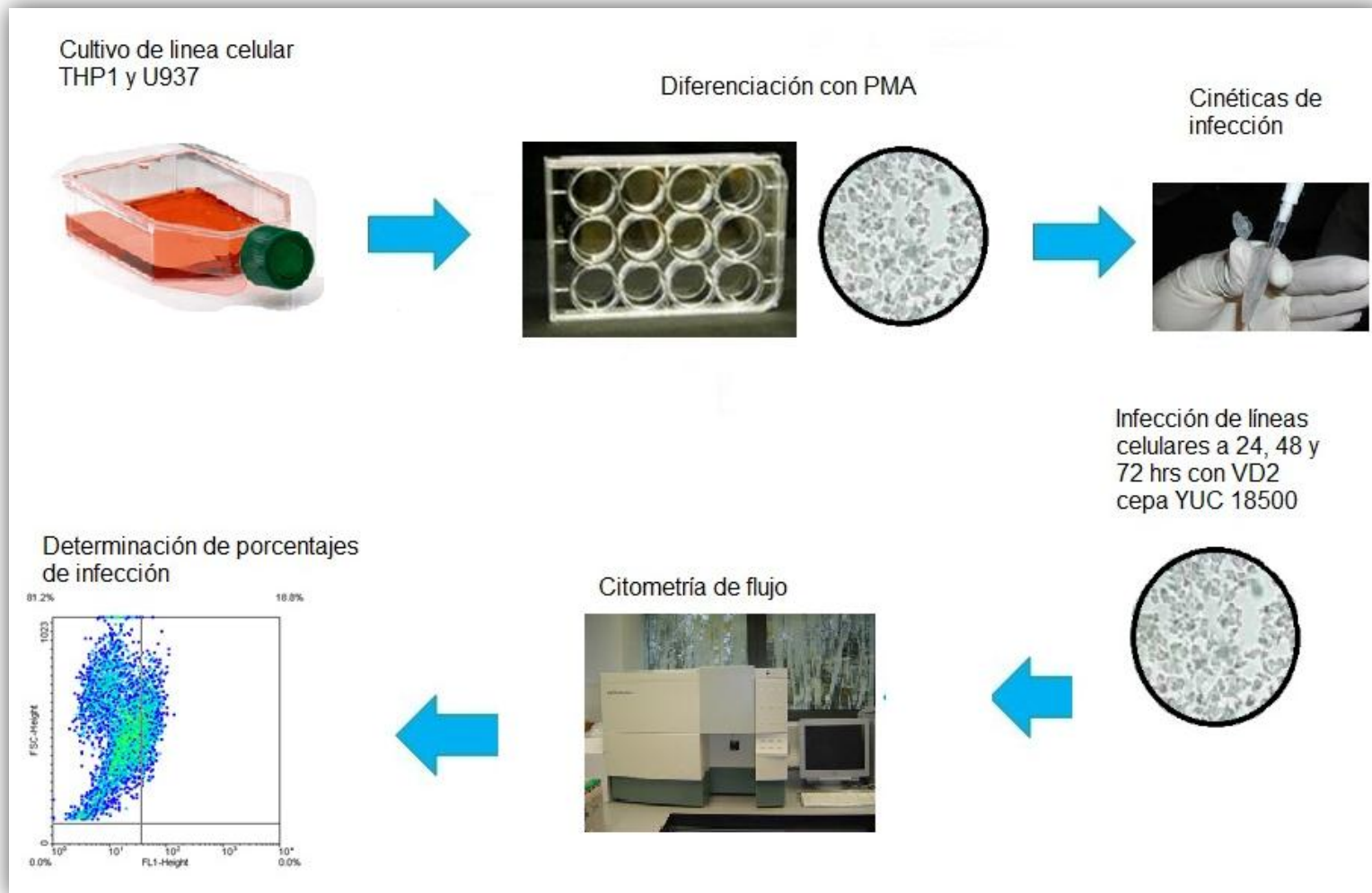


Figura 8. Cuantificación de porcentajes de infección en línea celular U937 y THP1. Las líneas celulares U937 y THP1 fueron diferenciadas con PMA, posteriormente se determinó el porcentaje de infección a diferentes tiempos (24, 48 y 72hrs) mediante citometría de flujo, cuantificando la presencia intracelular de la proteína E del DV2.

Diseño experimental 2: Análisis cuantitativo de los fosfopéptidos

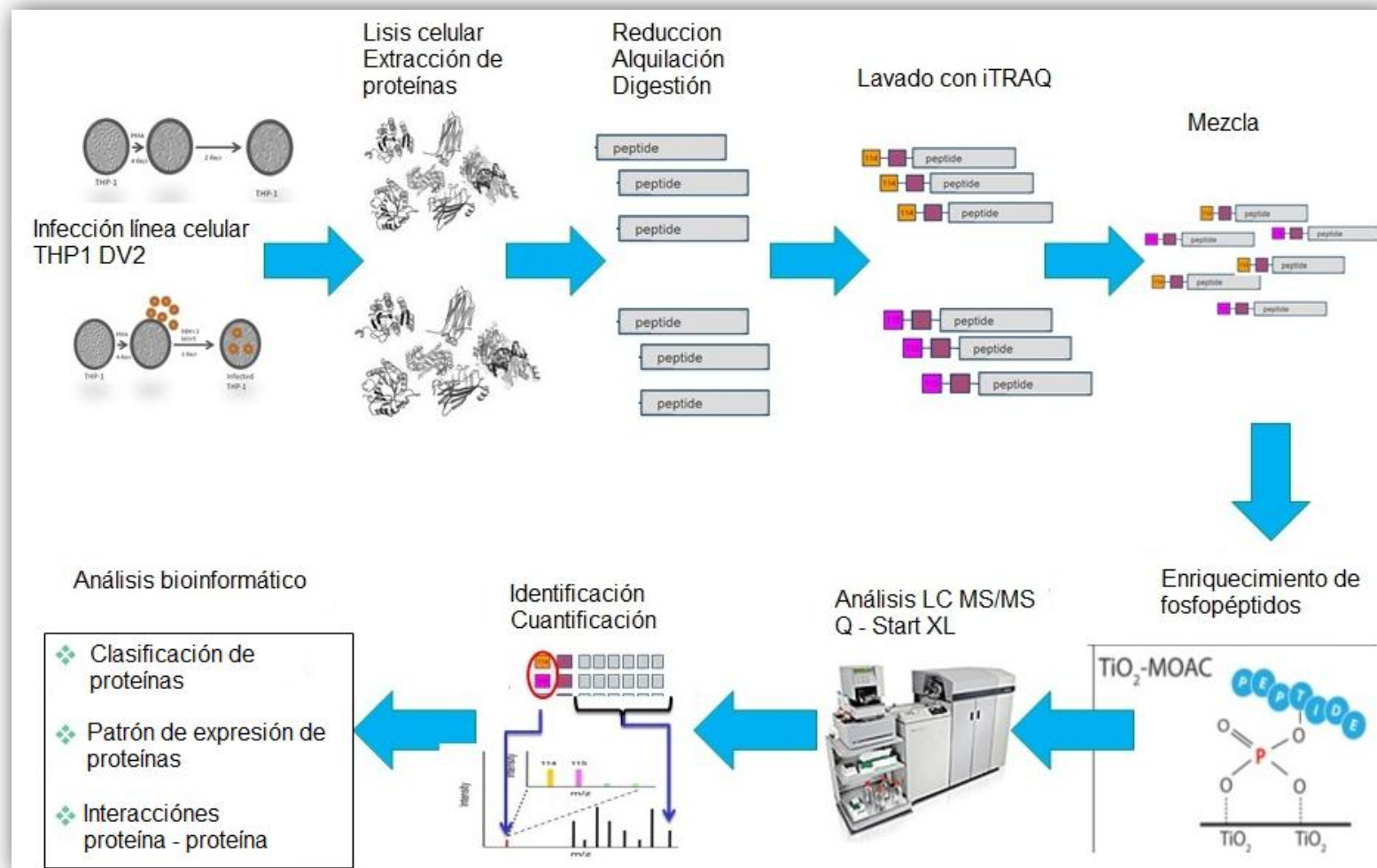


Figura 9. Diseño experimental del análisis del fosfoproteoma de la línea celular THP1 infectada con DV2 cepa 18500. Las proteínas celulares se obtienen mediante un buffer de lisis y se cuantifican. Luego se digieren proteolíticamente con tripsina y los péptidos obtenidos son marcados por medio del reactivo iTRAQ. Los fosfopéptidos se separan mediante una columna de TiO₂. La muestra enriquecida, es analizada por espectrometría de masas para su identificación y cuantificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

LINEAS CELULARES

Una de las líneas celulares de monocitos que se usan con mayor frecuencia para estudios de biomedicina es la línea celular THP1 (Human acute monocytic leukemia cell line), ésta procede de un paciente masculino de un año de edad con leucemia monocítica aguda. Estas células expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b, sin embargo, no expresan inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas. Están caracterizadas por su capacidad fagocítica y por la producción de lisozimas y esterasa, Al tratar las THP-1 con 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA) se observa adherencia a las superficies de cristal, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos⁶³.

Otra línea celular usada frecuentemente es la línea celular U937 fue aislada de un linfoma histiocítico de un paciente masculino de 37 años. Estas células secretan un gran número de citosinas y quimiocinas al igual que la línea celular THP1. Al tratarlas con 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA) se observa adherencia a las superficies de cristal, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos⁶³.

La línea celular THP1, fue cultivada en medio RPMI advanced suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Ontario, Canada), 200 mM de L-glutamina, 200 mM de antibióticos (estreptomicina ampicilina), y 2 % final de bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich), en cajas para cultivo.

La línea celular U937, fue cultivada en medio RPMI advanced suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Ontario, Canada), 200 mM de L-glutamina, 200 mM de antibióticos (estreptomicina ampicilina fungizona), y 2 % final de bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich), en cajas para cultivo.

STOCK VIRAL

Las cepa viral que se uso en este estudio fue obtenida de un caso clínico realizado en 2008, denominado DENV-2 Yuc18500. El aislamiento se realizó a partir del suero de un paciente con diagnóstico de fiebre hemorrágica por dengue en el estado de Yucatán en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales “Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán y fue una amable donación de la Dra. María Alba Loroño Pino.

PROPAGACIÓN DE VIRUS DENGUE

El VD obtenido del aislado clínico se propagó en ratones neonatos cepa Balb-C. Cada uno de los ratones neonatos de la camada fue inoculado en la región occipital con un 100µl de extracto de virus dengue, con una jeringa de insulina. Se sacrificaron los ratones, al presentar manifestaciones clínicas. Se extrajo el tejido cerebral mediante punción occipital con jeringa de 5ml. Se colectaron 2 cerebros en un tubo eppendorf se machacaron y posteriormente se añadió un volumen de medio MEM. Se centrifugó el tubo eppendorf a 13 000 rpm 30 minutos a 4°C y se extrajo la primera fase la cual se colocó en tubos eppendorf, posteriormente se volvió a centrifugar a 13 000 rpm 15 minutos a 4°C. Se extrajo de igual forma la primera fase. Se filtró la el extracto en un filtro de .42µm y posteriormente en uno de .20 µ, se hicieron alícuotas y se guardaron a -70°C hasta su uso⁶⁴.

TITULACIÓN VIRAL

Los títulos de DV fueron determinados por ensayos de placa en células BHK21⁶⁵, Las células BHK fueron crecidas en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, cuando las células alcanzaron una confluencia de 80 a 90% fueron inoculadas con diluciones del virus entre 10^{-1} a 10^{-8} . Después de 2 horas de absorción, se adicionó a la monocapa medio MEM adicionado con carboximetilcelulosa al 3% (Sigma), 0.5% de suero fetal bovino y 2mM de L-glutamina. Las placas fueron incubadas a 37° por 6 días, posteriormente se fijaron con formalina al 10% y se tiñeron con naftol blue black al 0.5% (sigma) para realizar el conteo de la formación de placas y determinar el título viral.

INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Se sembraron 1,000 000 de células, posteriormente se realizó su diferenciación con una solución de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) a una concentración final de 160 nM. se incubaron por tres días a 37°C. Posteriormente se realizaron dos lavados con medio libre de suero y se infectaron a las células con DV-2 Yuc18500 a una MOI de 5 a 37° por 2 horas. Después se desechó el inoculo viral lavando dos veces con medio RPMI sin antibióticos, sin suero y se adicionaron 450µl de medio de mantenimiento con 5% SFB y se incubaron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ los tiempos indicados para la cinética.

DETECCIÓN DE CÉLULAS INFECTADAS MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO

Se realizó un curso temporal de infección de células THP1 con DV2. A las 12, 24, 48 y 72 horas post-infección, se realizó el análisis de las células infectadas

mediante citometría de flujo.

Para ello, se lavaron las células infectadas y no infectadas con PBS1x frío, retirando el sobrenadante y adicionando un volumen de PBS1x. Se despegaron cuidadosamente las células empleando un “*scraper*”, recolectándolas en un pozo de una multiplaca de 96 pozos con fondo en “U” y se concentrarán por centrifugación a 800 r.p.m por 8 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante cuidadosamente sin aspirar las células, se dejó aproximadamente un volumen de 50 uL.

Bloqueo: Se adicionó al botón celular 100 uL de una solución de suero fetal bovino (SFB) al 10% en PBS1x frío. Se colocó por 20 min a 4°C en oscilación lenta.

Permeabilización: se adicionó al botón celular 100 uL de saponina fría. Se dejó por 20 minutos y se lavó con 3 volúmenes de PBS1x frío. Se concentraron las células por centrifugación, 800 r.p.m. por 6 minutos.

Marcaje primario: Se adicionó anticuerpo primario (Hb-112 hibridoma mouse anti E dengue, previamente estandarizado) dilución 1:200, en una mezcla de PBS frío con PBS con SFB 1% (3:1 respectivamente). Se incubaron 20 min a 4° en oscilación lenta en cuarto oscuro. Se lavaron con PBS1x (2 veces) retirando el sobrenadante cuidadosamente sin aspirar las células.

Marcaje secundario: se adicionó anticuerpo secundario (FITC-Goat, IgG Htl 62-6511 Invitrogen previamente estandarizado) dilución 1:200, en una mezcla de PBS frío con PBS con SFB 1% (3:1 respectivamente). Se incubó a 4°C durante 20

min en oscilación lenta. Se lavó con PBS1x (2 veces) retirando el sobrenadante cuidadosamente sin aspirar las células

Fijación: Se disgregó el botón celular y se adicionaron 100 uL de paraformaldehído al 1% en PBS1x. Se resuspendió el botón celular en 300 uL de PBS1x y se analizó en el citómetro para su detección. Mínimo de eventos: 10.000 células⁶⁶.

EXTRACCION DE PROTEINAS TOTALES

Después de 48 horas post infección las células infectadas y los controles fueron lisadas en Urea(6M) thiourea (2M) . buffer CHAPS (4%), posteriormente fueron precipitadas el reactivo 2D clean up (GE Healthcare Life Sciences).

ANÁLISIS PROTEÓMICO

Este se realizó en la Unidad de Proteómica de la Universidad de San Francisco en el laboratorio del Dr. Alma Burlingame a continuación describo a grandes rasgos la técnica utilizada. Para realizar este análisis seguimos la metodología descrita por Trinidad y col⁶⁷.

iTRAQ

Las etiquetas de iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation) consisten en un grupo reportero (114, 115, 116 y 117 Da), un grupo de equilibrio o balanceador y un grupo aminoreactivo que se une covalentemente a los péptidos generados por corte enzimático. (Figura 7)

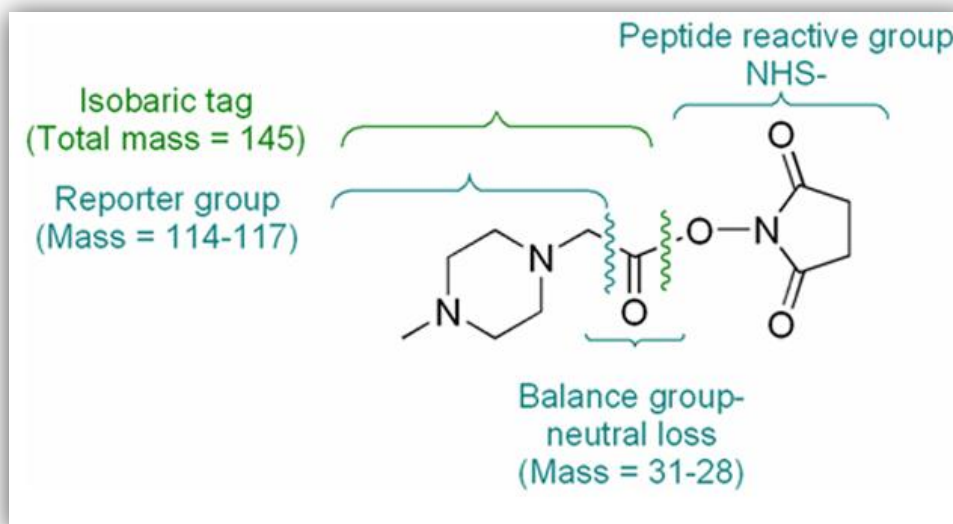


Figura 10 Estructura del reactivo iTRAQ.⁶⁸ Las etiquetas de iTRAQ consisten en un grupo reportero, un grupo de balance y un grupo aminoreactivo.

El grupo de equilibrio o balance confiere el mismo valor m/z a todas las etiquetas, siendo que péptidos generados de la misma proteína en diferentes condiciones de tratamiento tendrán la misma masa molecular, pero reporteros de masas moleculares diferentes.

Como los péptidos generados en las 4 distintas condiciones tendrán las mismas propiedades físico-químicas e igual masa molecular, tendrán tiempos de retención iguales en el sistema de cromatografía líquida. Sin embargo, cuando el ion precursor que contiene las 4 diferentes etiquetas es detectado en el espectrómetro de masas y sometido a fragmentación (MS/MS) producirá un solo espectro de fragmentación (para la información de secuencia) y cuatro masas correspondientes al reportero, donde la abundancia de la proteína en cada condición de estudio es determinada a través de la intensidad del pico del ion reportero correspondiente⁶⁹. (Figura 8)

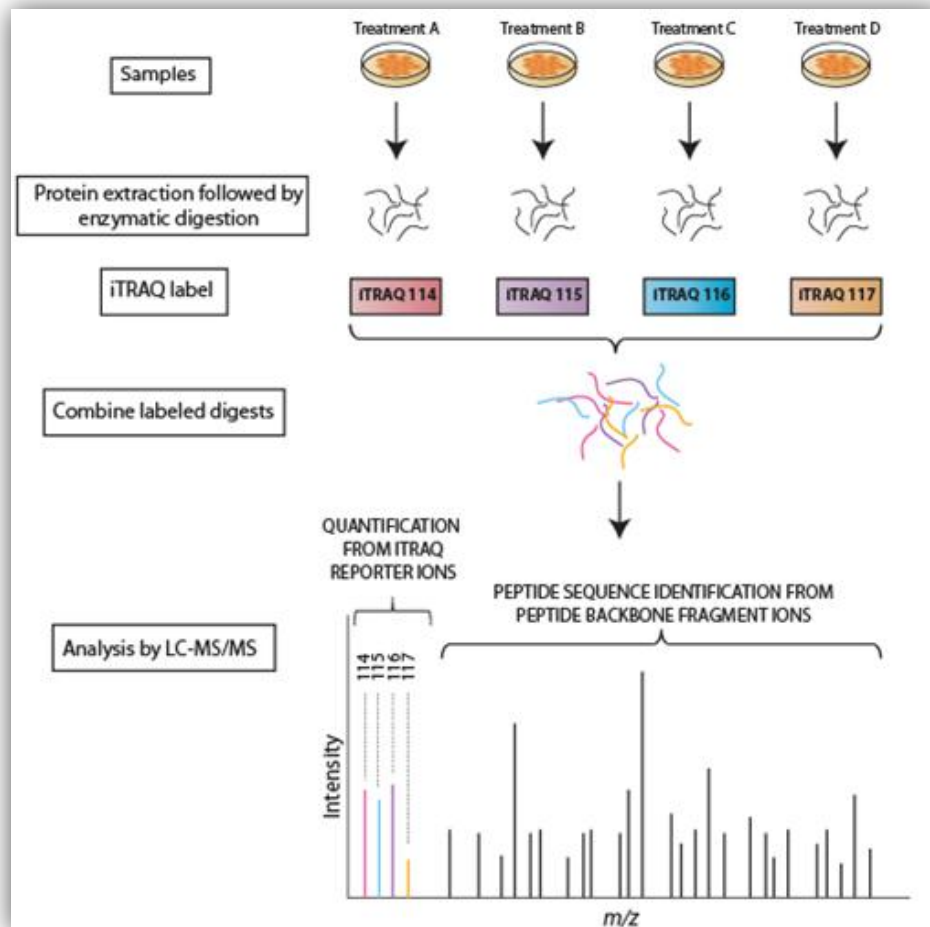


Figura 11 diagrama de flujo iTRAQ ⁷⁰. Los péptidos generados en las 4 distintas condiciones tendrán las mismas propiedades, por lo tanto tendrán tiempos de retención iguales. Sin embargo, cuando el ion precursor que contiene las 4 diferentes etiquetas es detectado en el espectrómetro de masas, producirá un solo espectro de fragmentación y cuatro masas correspondientes al reportero, donde la abundancia de la proteína en cada condición de estudio es determinada a través de la intensidad del pico del ion reportero correspondiente.

Marcaje isotópico por medio de iTRAQ

Para el análisis proteómico, se realizaron los experimentos de infección por duplicado. Entonces se analizaron dos muestras control y dos muestras infectadas. 500 mg de péptidos de cada condición fueron marcadas con el reactivo iTRAQ (Applied Biosystems) de acuerdo al protocolo del producto. Una vez

marcadas se combinaron las muestras (control-114, control-116, infectada-115, infectada-117), para su posterior enriquecimiento por cromatografía.

Enriquecimiento y análisis de fosfopéptidos

El enriquecimiento de los fosfopéptidos se realizó mediante una columna cargada con dióxido de titanio y se llevó a cabo en FPLC AKTA purifier. (GE Healthcare Sciencies). Se usaron 5 μm de dióxido de titanio (GL Sciences, Tokyo Japan) empaquetados en una columna analítica con 62 μL de volumen (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA USA). Los péptidos marcados con iTRAQ fueron resuspendidos en 250 μL de solución de lavado (35% acetonitrilo, 4.5% TFA) e inyectados en forma automática sobre la columna de titanio a una velocidad de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ con un lavado 3.9 ml para remover los péptidos no fosforilados. Los péptidos fosforilados fueron eluidos directamente de la columna de TiO_2 a una columna de fase reversa C18 (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA) usando 15 mL de la solución de elución (1M KH_2PO_4). La columna C18 fue lavada con 17.1 mL de TFA. Los péptidos fueron eluidos de la columna C18 usando 400 μL de solución de elución orgánica (50% acetonitrile, 0.1% TFA), se colectaron 35 fracciones que fueron analizadas en el espectrómetro de masas Q-START XL.

Identificación y cuantificación relativa de las fosfoproteínas

La identificación y la cuantificación de las fosfoproteínas se hicieron de forma automática utilizando el motor de búsqueda SEQUEST del programa computacional Discovery 1.0. Para el análisis de los datos fueron pre-determinados diferentes parámetros como alquilación de las cisteínas con iodoacetamida, marcaje isotópico con iTRAQ quadriplex de los N-terminales y lisinas, oxidación de metioninas, número mínimo de iones por “scan” (1×10^4),

tripsina como endoproteinasa y *Homo sapiens* como base de datos. Los análisis estadísticos fueron realizados por el programa Discovery 1.0 y en el programa PROSPECTOR considerando la intensidad de los iones precursores, número de péptidos coincidentes por proteína y sus correlaciones de intensidad.

ANALISIS BIOINFORMATICO DE PROTEINAS IDENTIFICADAS

Para el análisis se usaron las siguientes bases de datos:

- Uniprot <http://www.uniprot.org>
- String: functional protein association networks <http://string-db.org/>
- Panther: Protein Analysis Through Evolutionary Relationships
<http://www.pantherdb.org/>

Con estas bases de datos se hizo un análisis para determinar posibles interacciones biológicas entre proteínas, funciones moleculares, localización celular, así como su papel en diversas rutas metabólicas.

Uniprot

The universal Protein Resource, es una base de datos de secuencias de proteínas, está compuesta de cuatro componentes principales, cada uno optimizado para sus diferentes usos: the UniProt Archive, the UniProt Knowledgebase, the UniProt Reference Clusters, the UniProt Metagenomic and Environmental Sequence Database.

STRING

Es una base de datos de interacciones proteicas predichas, estas interacciones incluyen, asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) y estas son derivadas de diferentes fuentes: contexto genómico, experimentos experimentos

high-throughput, coexpresion, conocimientos previos (pubmed); STRING integra cuantitativamente datos de interacciones de estas fuentes para un gran número de organismos y transfiere información entre estos organismos cuando es aplicable.⁷¹

PANTHER

El sistema de clasificación de PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) es una base de datos que clasifica los genes por sus funciones, usando evidencia de trabajos científicos publicados, así como relaciones evolutivas para predecir una función aún en ausencia de evidencia experimental directa.⁷² La clasificación para vías consiste en 165 vías, cada una con subfamilias y secuencias de proteínas mapeadas para cada molécula.⁷³

RESULTADOS

Evaluación de la infección en líneas celulares.

Estudios recientes han demostrado que los monocitos son el principal blanco del virus dengue en humanos⁴. Por ello, en este trabajo analizamos la infección con el virus dengue de las líneas celulares THP1 y U937, que son modelos in vitro de la infección de DV en monocitos. Adicionalmente, existen pocos datos en la bibliografía donde se mencione el porcentaje de infección.

Las líneas celulares monocíticas THP1 y U937 en su estado no diferenciado exhiben bajos niveles de infección viral con DV, por lo que para obtener un porcentaje mayor de infección fue necesario diferenciarlas con PMA, una vez diferenciadas se verificaron los cambios fenotípicos que estas presentaron como consecuencia de la diferenciación. Figura 12

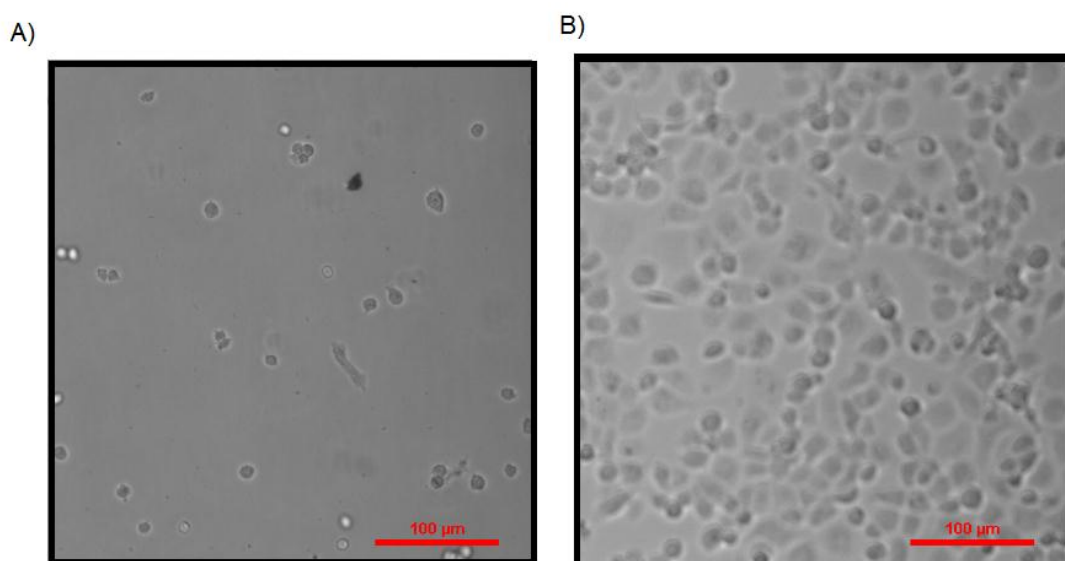


Figura 12. Línea celular THP1. A) Cultivo no diferenciado, células no adherentes en distintos planos. B) Cultivo 48 hrs después de la diferenciación, se observa células adheridas formando una monocapa.

Se observó un cambio morfológico hacia células fusiformes, en el cultivo diferenciado, sin embargo el cambio más significativo fue la adherencia y formación de una monocapa en la superficie del frasco, en ambas líneas celulares.

Una vez diferenciados los cultivos celulares se procedió a realizar los ensayos de infección tal y como se describió en material y métodos.

Detección de células infectadas mediante citometría de flujo.

El objetivo primordial al inicio de este trabajo, fue determinar el porcentaje de infección de las líneas celulares monocíticas con DV2.

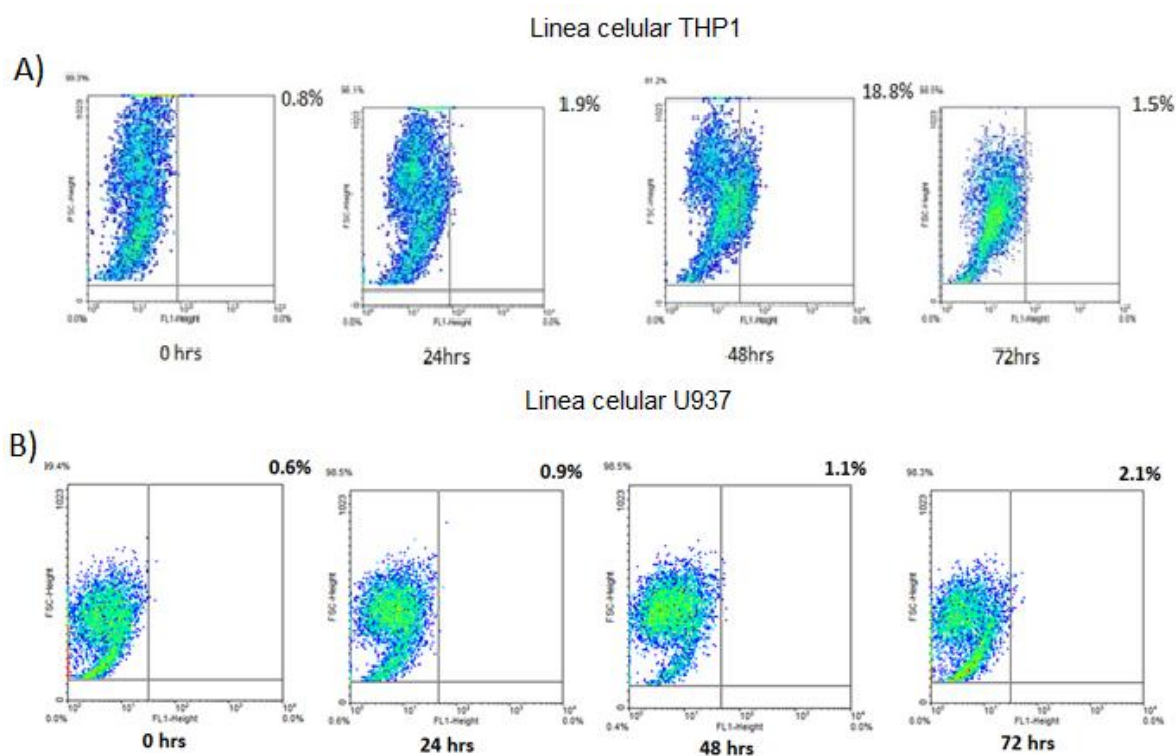


Figura 13. Cinética de infección de las líneas celulares THP1 y U937 con DV2 YUC18500. A) Histograma representativo de un experimento donde se observa el mayor porcentaje de infección a las 48 hrs en la línea celular THP1. B) histograma representativo de un experimento donde se observa el mayor porcentaje de infección a las 72 hrs en la línea celular U937.

Dado que el ensayo de titulación en placa del virus dengue no se puede realizar en lisados provenientes de monocitos (debido a que las células se despegan), se usó la técnica de citometría de flujo para evaluar el porcentaje de infección de células THP1 y U937 infectadas con el virus dengue 2. Se verificó la presencia intracelular de la proteína E del virus, de acuerdo a la metodología anteriormente descrita.

Se realizó un curso temporal de infección en ambas líneas celulares con el virus DV2 cepa YUC18500 a una MOI de 1, se cosecharon las células infectadas a las 24, 48 y 72 horas post-infección (pi), cada condición con su respectivo control. En la figura 13 se muestran dos experimentos significativos en ambas líneas celulares.

El análisis estadístico de las muestras procesadas indica un aumento significativo de la infección en la línea celular THP1 las 48hr pi, donde el 14% de las células presentan proteína E en su interior, mientras que las células U937 presentan su mayor porcentaje de infección (2.3%) a las 72 hrs pi, y este es menor en comparación con la línea celular THP1.

A las 96 horas p.i. las líneas celulares presentan una morfología granular, con un porcentaje de muerte entre 50-60% medida con Azul de Tripano.

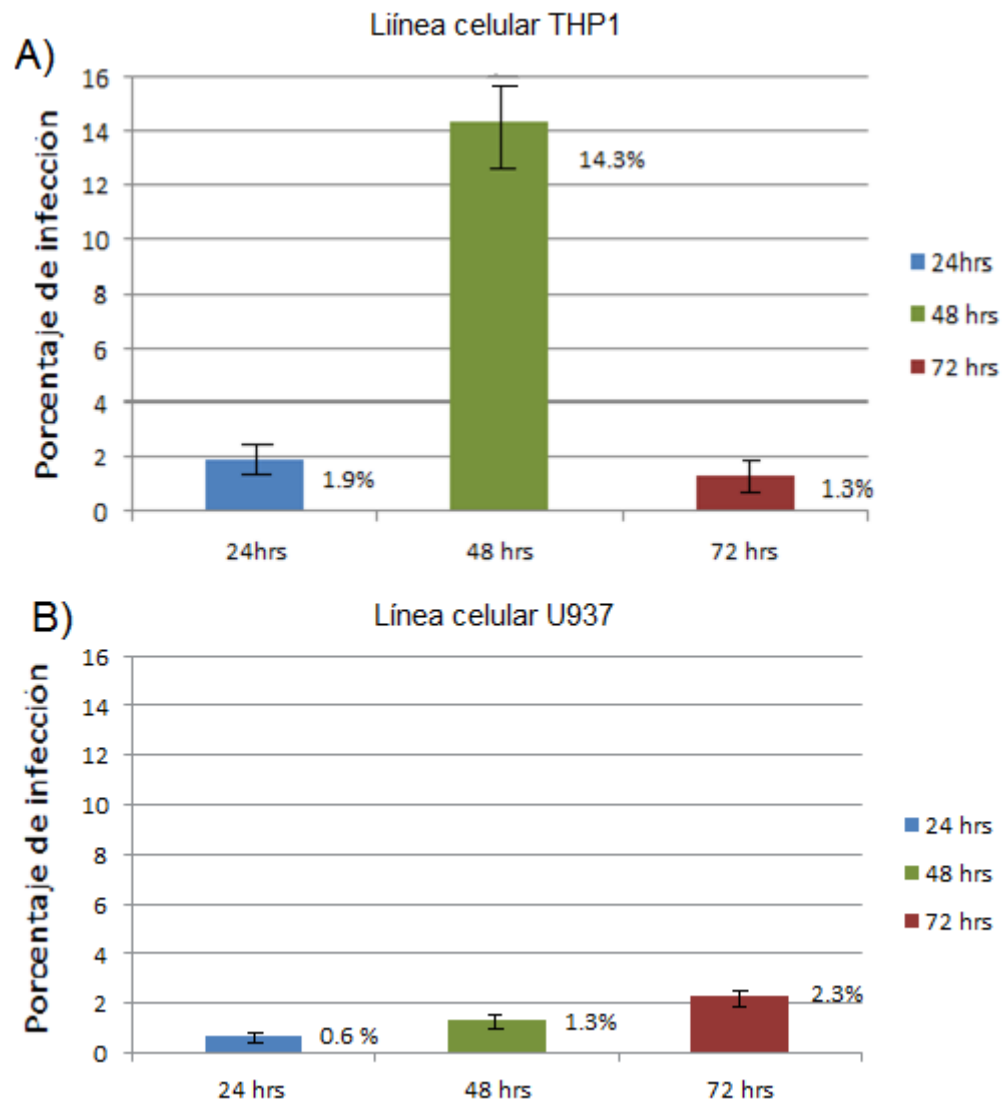


Figura 14. Cinética de infección de las líneas celulares THP1 y U937 con DV2 YUC18500. A) Evaluación de todas las cinéticas de infección realizadas en la línea celular THP1. B) Evaluación de todas las cinéticas de infección realizadas en la línea celular U937.

Análisis proteómico

En los estudios proteómicos es importante que el 100% de la muestra problema presente la condición que se quiere analizar, en nuestro caso la infección de DV. Por ello, en el paso anterior se determinó que célula monocítica se infecta mejor. Y dado que no existen estudios de proteómica en monocitos o en líneas celulares

monocíticas, se decidió seguir el estudio proteómico con un porcentaje de infección no óptimo.

Los resultados anteriores indican que la línea celular THP-1 presenta un porcentaje de infección mayor que la línea U937. Debido a esto se realizó el análisis del fosfoproteoma en la línea celular THP1 a las 48 horas pi.

Para estudiar los cambios en el estado de fosforilación de las proteínas de los monocitos infectados con el virus dengue, se infectaron células THP1 activadas con PMA con el DENV-2 Yuc 18500, y se lisaron las células a las 48 horas post infección.

Las proteínas del lisado celular se precipitaron con acetona y fueron enviadas para su análisis a la Unidad de Proteómica de la Universidad de San Francisco en el laboratorio del Dr Alma Burlingame.

Un paso fundamental fue el enriquecimiento de los fosfopeptidos mediante una columna de afinidad cargada con TiO_2 . Luego de obtener los fosfopéptidos, se procedió al desalado de la muestra usando una columna C18 antes del análisis de los péptidos por espectrometría de masas. Cabe resaltar, que las sales inhiben la ionización de los péptidos. En la gráfica anterior (grafico 5) se muestra el cromatograma de la separación de péptidos en la columna C18.

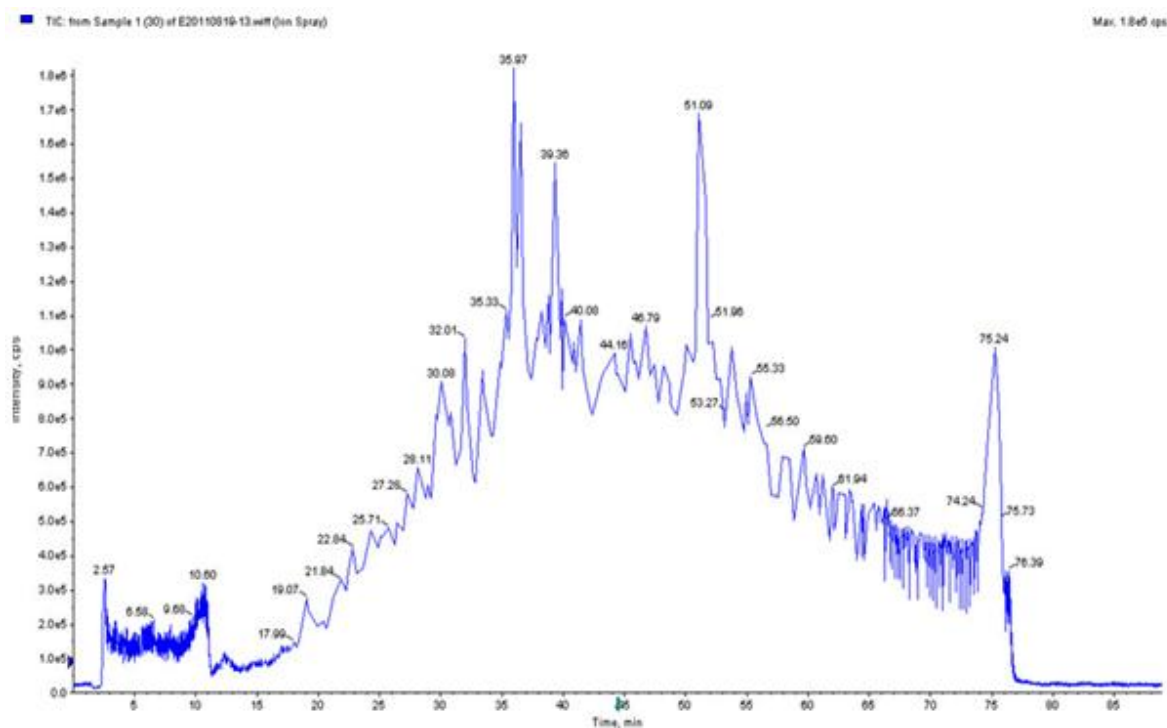


Figura 15. Cromatograma de la separación de péptidos en la columna C18. Los peptides fosforilados son eluidos de la columna de afinidad cargada con TiO_2 directamente dentro de la columna C18 (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA) usando la solución de elución (1M KH_2PO_4). Posteriormente los peptides son eluidos de la columna C18 usando la solución orgánica (50% acetonitrile, 0.1% TFA). Posteriormente cada fracción, es analizada en el espectrómetro de masas.

Se escogieron 35 fracciones para su análisis por EM, en base a su detección espectrométrica. Las diferentes fracciones fueron analizadas en el espectrómetro tipo LC MS/MS en la gráfica 6 Se muestra a modo de ejemplo el análisis de una fracción, con su respectivo espectro de masas MS y MS/MS Q-START XL (Applied Biosystems).

Cabe resaltar que este último fue adquirido en dos modos, uno que cubre las masas de 110-120 Da para analizar la etiqueta de masas de cada condición y otro de 200 a 1500 para el análisis del ion peptídico correspondiente.

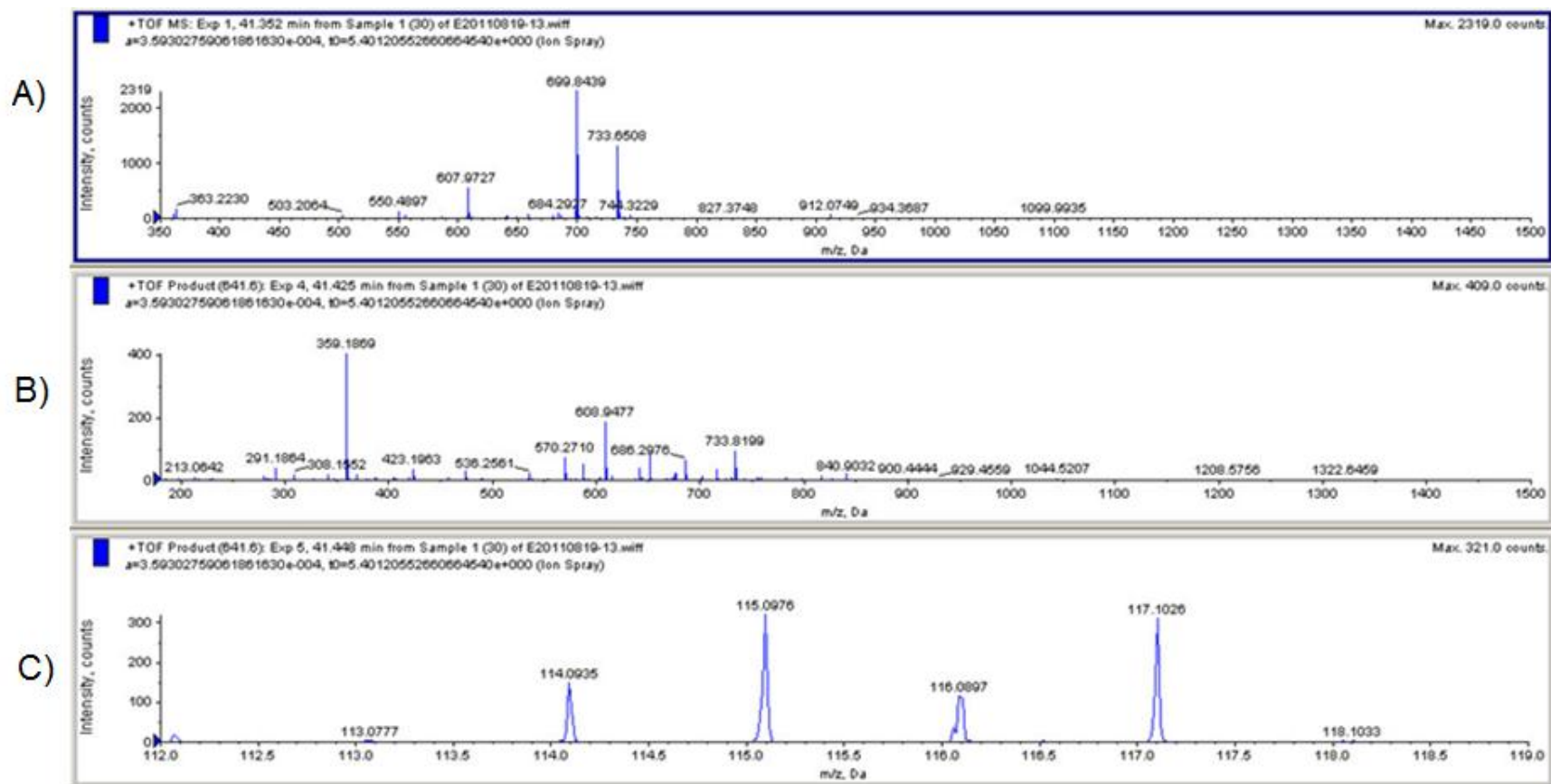


Figura 16. Análisis de una fracción, con su respectivo espectro de masas MS y MS/MS. A) Espectro de una fracción obtenida en la columna C18. B) Espectro de masas MS/MS (para información de la secuencia) C) Espectro de masas correspondientes al reportero, donde la abundancia de la proteína de cada condición fue determinada a través del pico de la etiqueta de masa correspondiente (114, 115, 116 y 117 Da).

El análisis por EM de los péptidos presentes en las 35 fracciones cromatográficas, dio como resultado la identificación de 1105 fosfopéptidos que cambiaron su estado de fosforilación. Para la cuantificación relativa de estos péptidos solo se consideraron los péptidos que cambiaran su estado de fosforilación 4 veces (en otras palabras nuestra línea de base fue 4). 51 fosfopéptidos cumplieron este criterio, 47 bajaron su estado de fosforilación en la célula infectada y 4 la aumentaron. (Figura 17)

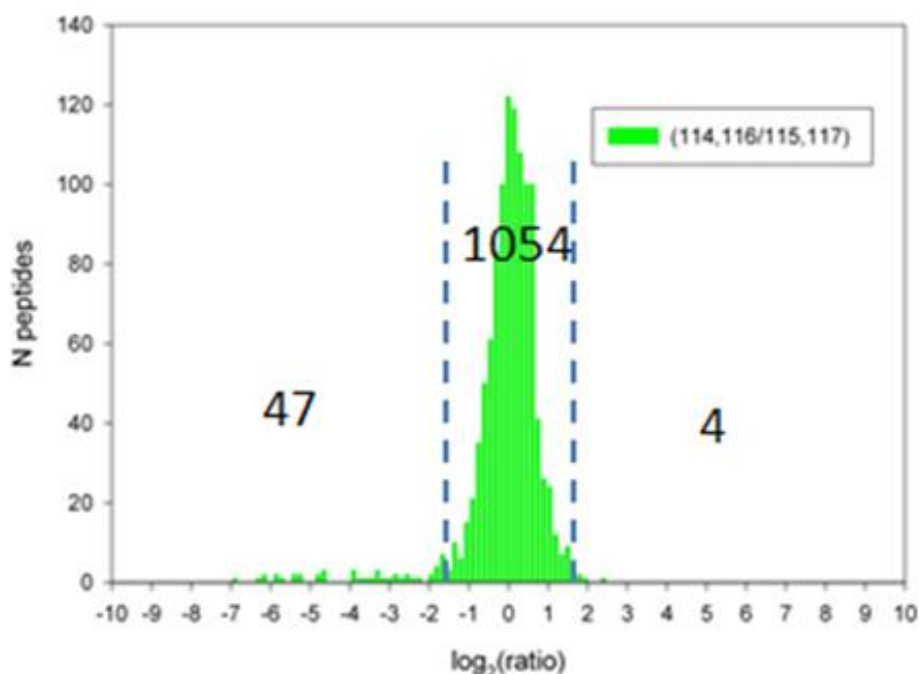


Figura 17. Histograma de los fosfopéptidos que cambian su estado de fosforilación. Se identificaron 1105, 47 disminuyeron su estado de fosforilación 4 veces, y 4 lo aumentaron.

Los 51 fosfopéptidos seleccionados en base al cambio de su nivel de fosforilación, corresponden a 45 proteínas. Con el identificador de cada proteína se utilizó la base de datos Uniprot para encontrar su función molecular reportada, las cuales se muestran en la siguiente tabla. (Tabla1).

	PROTEINA	AMINOACIDO FOSFORILADO	FUNCION MOLECULAR		N spectra
SUB EXPRESADAS					
STMN1	Stathmin	Serina	Proteína reguladora de sistema de microtubulos.	-6.39	1
KIF1A	Kinesin-like protein KIF1A	Serina	Proteína motora de transporte de organelos	-6.24	1
USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	Treonina	Hidroliza polímeros poliubiquitinados	-5.99	1
STX1B	Syntaxin-1B	Serina	Receptor celular para transporte de vesículas.	-5.93	2
MYO5A	Myosin-Va	Serina	Proteína involucrada en transporte y anclaje vesicular	-5.73	1
MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	Serina	Proteína de citoesqueleto, involucrada en dinamica de microtubulos, facilitando interacciones actina-microtubulo.	-5.47	1
MARCKSL1	MARCKS-related protein	Serina	Involucrada en sist transducción de señales de calmodulina.	-5.46	3
NBEA	Neurobeachin	Serina	Ancla cinasas al citoesqueleto y/u orgánelos	-5.29	3
DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Treonina	Señalización de semaforinas clase 3, remodelación de citoesqueleto	-7.03	4
MAPT	Microtubule-associated protein tau	Treonina	Involucrada en ensamblaje y estabilidad de microtúbulos.	-4.84	1
PGRMC1	Membrane-associated progesterone receptor component 1	Serina	Receptor de progesterona	-4.74	1
DCTN1	Dynactin subunit 1	Serina	Involucrada en movimiento de vesículas en microtubulos.	-4.71	1
KLC2	Kinesin light chain 2	Serina	Proteína motora, movimiento de organelos en microtubulos	-4.70	1
C12orf51	Probable E3 ubiquitin-protein ligase C12orf51	Treonina	Proteina ligasa de ubiquitina E3	-3.99	1
GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta	Tirosina	Proteína reguladora de glicógeno sintasa.	-3.97	5
CTNNA2	Catenin alpha-2	Serina	Función de link entre receptores de cadherina y citoesqueleto	-3.97	1
AKT3	RAC-gamma serine/threonine-protein kinase	Treonina	Proteína cinasa, fosforila diversas proteínas.	-3.79	1
ENO1	Alpha-enolase	Serina	Enzima multifuncional involucrada en glicolisis.	-3.59	1
RCAN	Calcipressin-1	Serina	Proteína nuclear inhibidora de respuesta transcripcional calcineurina dependiente	-3.42	2
ATP8A1	Probable phospholipid-transporting ATPase 1A	Serina	Proteína involucrada en transporte de fosfolípidos de membrana.	-3.32	1
MYO9B	Myosin-IXb	Serina	Proteína motora involucrada en remodelación de citoesqueleto	-3.30	1
DYRK1	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	Tirosina	Proteína reguladora de funciones nucleares involucradas en proliferación celular.	-3.22	2
SRSF1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	Serina	Proteína involucrada en la regulación del splicing	-3.13	2

Tabla 1. Proteínas que cambian su estado de fosforilación, identificadas por iTRAQ.

	PROTEINA	AA FOSFORILADO	FUNCION MOLECULAR		N spectra
PRKCA	Protein kinase C alpha type	Serina	Cinasa involucrada en diversos procesos celulares: adhesión, transformación celular y ciclo celular	-2.97	1
HUWE1	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	Serina	Ligasa involucrada en ubiquitinación.	-2.85	4
SSP1	Osteopontin	Serina	Citocina involucrada en la regulación de expresión de INF.	-2.8	1
PGM2L1	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	Serina	Involucrada en metabolismo de la sucrosa	-2.65	1
PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	Serina	Proteína de unión a RNA, involucrada en splicing.	-2.63	2
PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Treonina	Subunidad reguladora del proteasoma 26s el cual esta involucrado en la degradación de proteínas ubiquitinadas.	-2.52	2
BRCA1	Breast and ovarian cancer susceptibility protein (Fragment)	Serina	Fosfoproteína que mantiene estabilidad genómica y actúa como supresor de tumores.	-2.01	1
RRP1B	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	Serina	Involucrada en procesamiento de RNA ribosomal	-1.98	1
ACTA2	Actin, cytoplasmic 1	Serina	Involucrada en motilidad, estructura e integridad celular.	-1.94	1
SLAC4A2	Anion exchange protein 2	Serina	Proteína involucrada en intercambio de iones de membrana	-1.86	1
FKBP15	FK506-binding protein 15	Serina	Involucrada en transporte de endosomas tempranos	-1.81	1
DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	Serina	Proteína involucrada en vincular la dineína con proteína adaptadoras que regulan la función de esta.	-1.79	6
YWHAE	14-3-3 protein epsilon	Serina	Proteína adaptadora implicada en regulación de diversas vías metabólicas.	-1.79	4
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Serina	Proteína formadora de canales de poro en mitocondria.	-1.78	2
SMEK1	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	Serina	Proteína reguladora de la actividad de PPPC4C en los centros organizadores del centrosoma de los microtubulos.	-1.75	1
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b	Serina	Involucrada en la formación de cuerpos multivesiculares.	-1.74	1
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	Serina	Proteína involucrada en ensamblaje de microtubulos	-1.73	1
ACIN1	ACIN1 protein	Serina	Proteína nuclear que induce condensación de la cromatina en apoptosis	-1.70	4
SOBRE EXPRESADAS					
NUCKS1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate	Serina	Proteína nuclear, puede ser fosforilada por cdk1	-1.73	1
NPM1	Nucleophosmin	Serina	Chaperona, involucrada en procesos de biogénesis ribosomal.	-1.75	4
CD44	CD44 antigen	Serina	Glicoproteína involucrada en interacciones celulares	-1.80	1
IL1B	Interleukin-1 beta	Serina	Citosina, mediador de respuesta inflamatoria.	-2.35	1

Tabla 1. Proteínas que cambian su estado de fosforilación, identificadas por itraq

Conociendo la función molecular reportada, se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos, con el objetivo de conocer si alguna de estas proteínas habían sido reportada en alguna infección viral. Se encontraron 5 proteínas (Tabla 2).

Proteína	Interacción viral	Autor
Unidad reguladora del proteasoma 26s	IFN causa decremento en niveles de 26 de proteasoma	Bose et al 2001
	Coxsackievirus	Rassman et al 2006
Cadena intermedia de dineína citoplasmática	Adenovirus	Bremmer et al 2009
14-3-3 epsilon	Coxsackievirus	Rassman et al 2006
	Hepatitis C	Aoki et al 2000
Proteína de canal selectivo de aniones dependiente de voltaje	Influenza virus	Zamarin 2005
Nucleofosmina	Coxsackievirus	Rassman et al 2006
	Papilomavirus	Mc closley et al 2009

Tabla 2. Proteínas reportadas en infecciones virales. Se realizaron las búsquedas bibliográficas en las bases de datos NCBI, UNiprot, Prosite.

Con el objetivo de identificar las interacciones entre las proteínas encontradas, se realizó un análisis en la base de datos STRING, en el siguiente grafico se muestran las interacciones (Figura 18). Las proteínas que han sido previamente descritas en infecciones virales, se señalan con flechas rojas.

	Homo sapiens genes (REF)	Lista proteínas			
Vías	#	#	Expected	+/-	Valor P
Sin clasificar	17 337	22	36.57	-	4.91E-08
Wnt signaling pathway	317	4	.67	+	4.44E-03
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	97	4	.20	+	5.44E-05
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	283	4	.60	+	2.97E-03
Huntington disease	167	4	.35	+	4.29E-04
Alzheimer disease-presenilin pathway	122	4	.26	+	1.31E-04
P13 kinase pathway	115	3	.24	+	1.87E-03
PDGF signaling pathway	159	3	.34	+	4.63E-03
FGF signaling pathway	124	3	.26	+	2.31E-03
EGE receptor signaling pathway	135	3	.28	+	2.94E-03
Cadherin signaling pathway	147	3	.31	+	3.73E-03
Angiogenesis	191	3	.40	+	7.67E-03
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	71	2	.15	+	9.96E-03
Ubiquitin proteasome pathway	70	2	.15	+	9.69E-03
P53 pathway	113	2	.24	+	2.39E-02
VEGF signaling pathway	75	2	.16	+	1.11E-02
T cell activation	102	2	.22	+	1.97E-02
Ras pathway	79	2	.17	+	1.22E-02
Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	61	2	.13	+	7.45E-03
Interleukin signaling pathway	161	2	.34	+	4.55E-02
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	89	2	.19	+	1.53E-02
Endothelin signaling pathway	91	2	.19	+	1.59E-02
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	98	2	.21	+	1.83E-02
Apoptosis signaling pathway	123	2	.21	+	2.79E-02
Synaptic vesicle trafficking	38	1	.08	+	7.71E-02
FAS signaling pathway	36	1	.08	+	7.32E-02

Tabla 3. Identificación de vías de señalización en la base de datos PANTHER.

infección del virus dengue. Se ha visto que durante la infección ocurre un aumento de gotas de lípidos (Lipid droplets), estas organelas son fundamentales para la replicación del virus⁷⁴ y se ha reportado que pueden tener una función emergente como coordinadoras de la respuesta inmune, ya que participan en la generación de prostaglandinas y leucotrienos, importantes mediadores del proceso

inflamatorio⁷⁵.

Por último, se realizó otro análisis bioinformático con la base de datos DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Cabe resaltar, que dependiendo del programa que se use para el análisis de un grupo de proteínas, los resultados pueden ser diferentes. Debido principalmente a los parámetros de los motores de búsqueda, estos están relacionados con la limpieza (exigencia) de las bases de datos que usen. Por ejemplo, Uniprot, sólo tiene datos donde existe una evidencia experimental de la proteína, mientras que NCBI no tiene sesgo. Otra diferencia es el número de proteínas que deben integrar una vía, para que el reporte de la misma tenga un valor p confiable. Los resultados de este análisis se muestran en la siguiente tabla:

Vía	Prot involucradas	Valor P	Benjamini
Leukocyte transendothelial migration	3	9,92E-2	6,2E-1
Toll like receptor pathway	3	7,5E-1	5,6E-1
Fc gamma R- mediated phagocytosis	3	6,8E-2	5,8E-1
ErbB signaling pathway	3	5,8E-2	5,9E-1
MAPK signaling pathway	5	3,0E-3	4,3E-1
Tight junction	4	2,2E-2	5,5E-1
Focal adhesion	5	1,2E-2	5,8E-1

Tabla 4. Identificación de vías de señalización en la base de datos PANTHER.

No es sorprendente encontrar que la infección de las células THP1 con el virus dengue induzca la vía MAPK de transducción de señales, ya que este tipo de señalización se da en respuesta a estrés, procesos inflamatorios y apoptosis entre otros. Adicionalmente, trabajos previos en células de mosquito⁷⁶ y células Hep2 infectadas con DV han descrito alteraciones en esta vía en respuesta a la

infección⁷⁷.

En referencia a las otras vías de transducción que son afectadas durante la infección, uniones estrechas y adhesiones focales, se conoce que durante la infección de las células con dengue, se induce reordenamientos del citoesqueleto. Así también se ha visto que la proteína no estructural NS5 se une a las proteínas PDZ, estas interacciones deben ser estudiadas con mayor profundidad ya que podrían explicar la habilidad de los flavivirus para manipular la proliferación y permeabilidad celular⁷⁸

DISCUSIÓN

El dengue es una enfermedad infecciosa dinámica y sistémica, que continua siendo un importante problema de Salud Pública a nivel mundial. Principalmente, debido a su rápida diseminación dependiente de vectores artrópodos y a que no existe una terapia antiviral específica, ni una vacuna profiláctica para contender la enfermedad.

Si bien el virus dengue fue aislado en el laboratorio en 1943⁷⁹. Recién en los últimos 20 años, se han dado importantes avances en el conocimiento de la biología del virus, la determinación de la estructura viral, de la estructura y función de sus proteínas⁸⁰ y en la elucidación de los mecanismos de replicación y traducción del genoma viral⁸¹. Sin embargo, la patogénesis del dengue es poco entendida y continua siendo un reto para los investigadores biomédicos.

Se conoce que la replicación de DV es fácilmente contralada en la mayoría de individuos después de un corto período de viremia (fiebre); aunque no se conocen que factores del huésped que participan en esta regulación. Se ha reportado que DENV es reconocido en las células de mamíferos por dos familias de receptores, endosomales y citoplásmicos, que inducen la respuesta de IFN α/β . La secreción de interferon estimula la señalización de JAK/STAT, lo que resulta en la activación de la transcripción de genes de respuesta a IFN, que a su vez permiten el establecimiento de una respuesta antiviral. Pero, este efecto es bloqueado por proteínas virales no estructurales NS4, NS2A y NS5³⁶, causando una inhibición de la señalización de JAK/STAT y por ende una inhibición de la activación de la

transcripción de los genes de respuesta antiviral. Estos datos sugieren, que el efecto antagonista de las proteínas virales a la respuesta celular vía IFN puede resultar en un cambio del grupo de proteínas que se expresan como resultado de la respuesta antiviral y ser responsables en parte de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La transducción de señales constituye una activa área de investigación en diferentes modelos eucarióticos. Sin embargo, el papel de la fosforilación durante infecciones virales ha sido poco explorado.

Lo anterior, hace evidente que se requiere un mayor esfuerzo en la investigación de las bases moleculares de la interacción patógeno-hospedero. Por ello, en este trabajo planteamos el estudio fosfoproteómico de células THP-1 infectadas con el virus dengue 2, con el objetivo de conocer las vías de transducción de señales que son afectadas como consecuencia de la infección. Cabe resaltar que este trabajo es pionero en el campo de virología del dengue, es una investigación exploratoria, que busca conocer en forma global los cambios en el nivel de fosforilación de las proteínas y con ello tratar de establecer las redes de interacción proteica que pueden ser afectadas durante la infección de los monocitos/macrófagos con el virus dengue.

El análisis proteómico combinando ITRAQ, enriquecimiento de fosfopéptidos por TiO₂ y espectrometría de masas, nos ha permitido la identificación de 1100 fosfopéptidos en la línea celular THP1, de estos 51 fosfopéptidos (que corresponden a 45 proteínas) cambian su estado de fosforilación en respuesta

directa o indirecta a la infección con el VD. Se encontró que la mayoría de las proteínas disminuyen su estado de fosforilación (41) y pocas lo aumentan (4) (Tabla1). Es probable que la disminución en la fosforilación sea el resultado de la intervención de las proteínas virales en la función celular, que resulta en una evasión y/o modulación de la respuesta celular frente a la infección. Sin embargo, dado que este estudio es global, se requieren realizar experimentos de infección y por otras metodologías como western blot o inmunofluorescencia para comprobar, que el nivel de fosforilación de las proteínas encontradas es diferente a la fosforilación de las células control.

Nuestros hallazgos muestran que las proteínas encontradas son parte de importantes vías metabólicas entre las que destacan apoptosis, sistema ubiquitinación-proteasoma, tráfico vesicular, fagocitosis, e inflamación, (tabla 4). El describir el fosfoproteoma de la célula infectada nos puede permitir ubicar proteínas que sirvan como nodo, esto es regulen varias vías de señalización.

En estudios previos, se ha analizado el proteoma de células Hep-2 y células endoteliales en respuesta a la infección con el ^{56, 57}. Estos trabajos no utilizan metodologías cuantitativas y analizan la proteína total no las fosforiladas, como es nuestro caso. Mencionan entre 15 y 30 proteínas que cambian su patrón de expresión en respuesta a la infección, cuya función está relacionada con la respuesta de interferón tipo I y con la activación del proteosoma. Cabe destacar que algunas proteínas encontradas en este trabajo hacen parte de estas vías, lo cual nos indica que estamos corroborando datos ya existentes y complementándolos con proteínas nuevas. Este set de proteínas distintas, pueden

ser producto de muchos factores tales como: tipo celular, condiciones de infección (Multiplicidad de infección), tiempo de estudio (horas post infección) enriquecimiento de proteínas fosforiladas y sensibilidad de la metodología (marcaje y espectrómetro de masas).

La búsqueda de información funcional de las proteínas que cambian su patrón de fosforilación en las células THP1 infectadas, nos muestra un grupo de cinco proteínas que han sido descritas previamente, en relación a la infección con otros virus. Se encontró que las proteínas PMSD1, VDAC1, YWHAE y DYNC1LI1 disminuyen su nivel de fosforilación como consecuencia de la infección, mientras que la proteína NMP1 aumenta su patrón de fosforilación.

Entre las proteínas que bajaron su expresión encontramos a:

1. **La subunidad 1 reguladora del proteasoma 26s** (PMSD1) la cual actúa como proteína reguladora del proteasoma, y funcionalmente está relacionada con la degradación de proteínas ubiquitinadas dependientes de ATP⁸². El sistema de ubiquitinación-proteasoma (SUP) representa la principal vía extra lisosomal para la degradación de proteínas, incluyendo las mal plegadas, por lo tanto no es sorprendente que este sistema esté involucrado en una variedad de procesos celulares tales como regulación de ciclo celular, reparación de ADN, presentación de antígenos, apoptosis, transducción de señales y regulación transcripcional.⁸³ Se ha descrito que muchos virus tales como rotavirus, coxsackievirus modifican este sistema para su propio beneficio^{84,85}. En el caso de virus dengue se ha reportado que la inhibición farmacológica de compoentes

del SUP^{86 87}, resulta en la disminución de la producción de partículas virales⁶⁹. Si bien el mecanismo molecular no es bien conocido, parece ser que SUP es requerida para la traducción y replicación del RNA viral⁵⁰. En este trabajo, se encontró una disminución de fosforilación de PSMD1, previamente se ha reportado que esta proteína se desfosforila por acción del interferón en células de pulmón⁸⁸. Se conoce que la infección de los monocitos con DV activa la respuesta a IFN, el encontrar PSMD1 fosforilada puede indicar que es producto de la respuesta a interferón en las células infectadas y no infectadas. Se tienen que realizar estudios posteriores para evaluar la función de esta proteína en el contexto de la infección de monocitos con el virus dengue.

2. ***Proteína de canal anion-selectiva dependiente de voltaje 1 (VDAC1)***, esta proteína se localiza en la membrana externa de la mitocondria, en la membrana plasmática y en combinación con otras proteínas forman un complejo que permite la difusión de moléculas hidrofílicas. Cambios de expresión de esta proteína se han relacionado con apoptosis. En una infección viral, la apoptosis puede ser un mecanismo de defensa contra la replicación del virus, diferentes trabajos mencionan que los virus han desarrollado estrategias para revertir los mecanismos de apoptosis. Feng et al reportan la interacción de la proteína vMAP (viral mitochondrial anti apoptotic protein) con la proteína VDAC1 que da como resultado la inhibición de la liberación de Citocromo c, impidiendo así el desencadenamiento del proceso de apoptosis⁸⁹. Se ha reportado inhibición de apoptosis en etapas tempranas de la infección con el DV⁹⁰. En el caso del virus influenza se ha descrito que la interacción de proteínas no estructurales con

VDAC1 desencadena el proceso de apoptosis en etapas tardías de la infección y se ha propuesto que la cascada apoptótica juega un rol fundamental en el procesamiento de las proteínas virales, maduración de las partículas virales, así como en la regulación de la respuesta inmune del hospedero a la infección.⁹¹ Por otra parte Ding et al sugieren que esta proteína puede tener un rol diferente: afectando la unión o la entrada del virus a las células, ya que en sus trabajos con virus de la encefalitis Japonesa, demuestran mediante técnicas de proteómica que una cepa celular resistente al virus tiene una expresión aumentada de esta proteína⁹². Se necesita hacer una búsqueda más exhaustiva sobre el rol de fosforilación en la actividad de esta proteína para relacionarla con la infección de monocitos con el virus dengue.

3. **14-3-3 epsilon** (YWHAE) es una proteína adaptadora implicada en la regulación de un gran espectro de vías generales y especializadas. Se une a un gran número de proteínas, usualmente en reconocimiento de un motivo fosfoserina o fosfotreonina. Su unión tiene como resultado la modulación de la actividad de la molécula a la que se une.⁹³ Al igual que la subunidad 26 s de proteasoma, esta proteína mostró una expresión diferencial en la células Hela y HepG2 infectadas por virus coxsackievirus⁶⁸. Otros estudios muestran que las proteínas 14 3 3 epsilon interactúan con proteínas virales, ejemplo de esto es la interacción con la proteína MT (middle tumor antigen) de poliomavirus teniendo como resultado el control de la proliferación celular contribuyendo al desarrollo de neoplasias,⁹⁴ al igual que interacción descrita con la proteína core del virus hepatitis C (HCV) activando la vía Raf.⁹⁵ En el caso de la infección con dengue no ha sido

descrita.

4. **La cadena ligera intermedia de la dineína citoplasmática** (DYNC1LI1) esta proteína es un componente accesorio no catalítico del complejo citoplasmático de dineína, se piensa que puede estar involucrada en la interacción de dineína con proteína adaptadoras que regulan su función. La Dineína citoplasmática 1 actúa como motor de la motilidad retrograda intracelular de las vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos⁹⁶. Diferentes estudios han demostrado que algunos virus interactúan con esta proteína. La dineína se une directamente a la cápside del adenovirus, para transportar el virus hacia el núcleo y completar su ciclo de replicación⁹⁷, si bien el DV en su ciclo de replicación no presenta etapas en el núcleo, estudios previos han demostrado la presencia algunas proteínas virales, dentro de este, por lo que esta proteína en interacción con NPM1 pudiera fungir como medio de transporte para las proteínas virales que se encuentran en el núcleo durante el ciclo de replicación viral.
5. Por último la única proteína que aumenta su patrón de fosforilación es la **Nucleofosmina** (NMP1) la cuál es una fosfoproteína nucleolar involucrada en distintas funciones, incluyendo transporte nuclear, proliferación celular y biogénesis ribosomal⁹⁸. Esta proteína tiene la habilidad de viajar entre núcleo y citoplasma y unirse a proteínas que presentan señal de localización nuclear, promoviendo así su importe a núcleo⁹⁹. Puede formar un complejo con la proteína p120 nucleolina y algunas proteínas virales como la proteína Rev y Tat de VIH¹⁰⁰. Para DV no se han descrito interacciones específicas con esta

proteína, y aunque DV no se replica en el núcleo, se conoce que la proteína C puede encontrarse en el núcleo y esto es requerido para la activación de apoptosis en células HepG2¹⁰¹. Así también, se ha reportado que la proteína no estructural NS5 (polimerasa), NS1 y NS3 se encuentran en núcleo y citoplasma^{102,103}, aunque no se conoce la función que desempeñan en él. Muy recientemente, se ha reportado que Ivermectin, un inhibidor específico de la importación de proteínas citoplásmicas al núcleo celular inhibe la infección del virus dengue¹⁰⁴. La creciente importancia que ha adquirido la presencia nuclear de proteínas virales en el ciclo de replicación, nos estimula al estudio de la función de NMP1 durante la infección de DV, mediante interferencia de RNA.

Dado que el nivel de infección de las células THP-1 es de aproximadamente el 60% de la población, puede ser que las diferencias encontradas respecto al control, célula no infectada, correspondan a una mezcla de células infectadas y no infectadas que coexisten en la muestra problema. Aunque, sólo se consideraron las diferencias de expresión de 4 veces el valor de la muestra control (célula THP1 no infectada). Por lo anterior, es necesario corroborar los datos de fosforilación de proteínas en una muestra problema, donde separemos por “cell sorting” la población de células infectadas (~60%) de las no infectadas (~40%) y así asegurar que los estudios funcionales se realicen sobre la población correcta.

Con el advenimiento de la genómica, en los últimos años, se han reportado estudios globales a nivel RNA mediante transcriptoma, que revelan que la sobreexpresión de genes relacionados con inflamación, con la respuesta antiviral

coinciden con los niveles de expresión a nivel de proteínas, por muchos factores, principalmente procesamiento del RNA, regulación de la traducción y modificaciones postraduccionales (Figura 19).

El análisis en conjunto de los trabajos reportados y de las proteínas fosforiladas encontradas en este trabajo, nos muestra que existen coincidencias en la actividad de algunas proteínas, como pueden observar en la figura 19. Estas coinciden en su función en el SUP y apoptosis. Sin embargo, la fosforilación de las proteínas que no se han reportado previamente abre una serie de posibilidades de estudio, para ampliar nuestro conocimiento de la interacción virus dengue-monocitos y así tener un mejor entendimiento del ciclo de replicación y las implicaciones que éste tiene en la patogénesis de la enfermedad.

Por otro lado, la intervención quimioterapéutica en las vías de transducción de señales ha permitido avances espectaculares en la farmacología moderna. Por ejemplo, una de las drogas de más éxito en la actualidad, el sildenafil (viagra), es un inhibidor de una fosfodiesterasa dependiente de GMP cíclico (GMPc), que interfiere en un órgano específico, con las vías de señalización dependientes de GMPc. En la actualidad, están en el mercado decenas de drogas que modulan las vías de transducción de señales. No obstante, en el caso de la infección del hombre con el virus dengue, no se ha explorado la intervención farmacológica de estas vías y dado que no existe vacuna ni terapia antiviral, puede ser una opción de control de la enfermedad.

Este trabajo nos muestra que la proteómica cuantitativa basada en espectrometría

de masas, es una herramienta que nos sirve para responder preguntas biológicas complejas y encontrar resultados novedosos. Adicionalmente, este proyecto, nos ha permitido generar las bases metodológicas para la implementación de esta tecnología en la Unidad de Proteómica del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, del Instituto Nacional de Salud Pública.

CONCLUSIONES

1. A las 48 horas post-infección, las células THP1 infectadas con el virus dengue contienen 45 proteínas celulares que cambian su nivel de fosforilación como respuesta directa o indirecta a la infección.
2. La cuantificación de los niveles de fosforilación nos indica que 44 proteínas disminuyen y 1 proteína aumenta el nivel de fosforilación en comparación a la proteína de la célula no infectada.
3. Las proteínas PMSD1, VDAC1, YWHAЕ, DYNC1LI1 y NMP1, se han reportado previamente en trabajos relacionados con infecciones virales.
4. Las vías metabólicas que pueden estar involucradas en la interacción virus dengue-monocitos son apoptosis, sistema ubiquitinación-proteasoma, tráfico vesicular, fagocitosis, e inflamación.

PERSPECTIVAS

Este trabajo hace parte del proyecto “Quantitative proteomic analysis of mononuclear cells infected with dengue virus using iTRAQ Labeling and tandem mass spectrometry CN-10398 UC-MEXUS/CONACYT.2010. En el cual se plantearon los siguientes objetivos: 1) Identificar en forma cuantitativa las proteínas celulares de monocitos que se expresan diferencialmente como consecuencia de la infección con el virus dengue. 2) Analizar cuantitativamente el fosfoproteoma de los monocitos infectados con DV. Actualmente, estamos realizando el análisis de las proteínas totales.

Dado que estos resultados son complementarios, con el listado general de proteínas tanto totales como fosforiladas, se tendrá una idea más clara de lo que ocurre en la célula THP1 (modelo de monocitos) a 48 horas después de la infección. Para corroborar estos resultados, se realizará western blot para comprobar el nivel de expresión tanto de la proteína total como de la proteína fosforilada. También se realizarán inmunofluorescencias, para evaluar si los cambios en expresión son en algún compartimento celular determinado.

Posteriormente, se tiene contemplado realizar el análisis funcional de un grupo de proteínas, las cuales se seleccionarán en base su nivel de expresión y a la función reportada en la bibliografía. Los estudios funcionales se realizarán mediante RNA de interferencia y se estudiará la función de la proteína estudiada en el contexto de la célula infectada. Con ello, se podrá saber si las proteínas que se expresan diferencialmente durante la infección tienen un papel en el ciclo de replicación viral

o sí el cambio en expresión es consecuencia de la respuesta de la célula a la infección.

Este trabajo abre una serie de posibilidades en la investigación de virología básica, búsqueda de biomarcadores de las formas graves de dengue y moléculas blanco para terapia antiviral.

El grupo de trabajo de la Dra. Pando, es nuevo en el CISEI-INSP y está tratando de consolidar la línea de investigación “Análisis funcional de la relación hospedero-patógeno”. Este trabajo es una prueba de que el abordaje de proteómica cuantitativa, nos puede dar respuestas a preguntas complejas y poco exploradas. Con la experiencia que hemos adquirido, tenemos como objetivo conocer los eventos celulares que son inducidos por la infección viral a tiempos cortos de la entrada del virus a la célula. Este conocimiento, es relevante para entender el “crosstalk” entre el virus dengue y los monocitos, para posteriormente extrapolar estos resultados a la infección de dengue en humanos. Este proyecto fue presentado para su evaluación en la Convocatoria CONACYT-Ciencia Básica 2012.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Kuhn RJ: The Flaviviruses. In Fundamentals of Molecular Virology. Edited by Acheson NH. John Wiley and Sons, 2004:182/190.
- ² Halstead, S. B. 2008. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 273-91.
- ³ Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu SJ, Putvatana R, Murphy G, Tassaneetrithep B, Burgess T, et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2001;6:219–224.
- ⁴ Zhihua K., Quinn M., Chen H 2008 “Monocytes, But Not T or B Cells, Are the Principal Target Cells for Dengue Virus (DV) Infection Among Peripheral Blood Mononuclear Cells” . *Journal of Medical Virology* 80:134-146.
- ⁵ WuSJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachte E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6:816–820.
- ⁶ Thepparit C, Smith DR. 2004. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: Identification of the 37-Kilodalton/67-Kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol* 78:12647–12656.
- ⁷ Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. 2000. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 74:7814–7823.
- ⁸ Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. 2000. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 74:7814–7823.
- ⁹ Rothman, A. L. 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 113(7): 946-51.
- ¹⁰ Global alert and response: Impact of dengue. World Health Organization 2010 [Consultado diciembre 2011]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.
- ¹¹ Areas de riesgo en transmisión. OMS 2006 [consultado enero 2012] Disponible en: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_DengueTransmission_20

06_10%20November.png

Áreas en riesgo de transmisión

¹² Vigilancia epidemiológica de dengue. Organización Panamericana de la SALud
Disponibile en <http://ais.paho.org/atlas/dengue/paneldengue1.html>

¹³ Panorama epidemiológico de fiebre y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas. SECRETARIA DE SALUD MEXICO 2012. [consultado enero 2012] Disponible en: http://www.dgepi.salud.gob.mx/denguepano/PANORAMAS_2012/PANODENGUE_SEM02_2012.pdf

¹⁴ Rigau-Perez J, Clark G, Gluber DJ, Reiter P, Sanders E, Vomdam A. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. *Lancet* 1999; 352

¹⁵ Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Harrison Principios de Medicina Interna 15 ed Mac graw hill. México 2002. Pp 1363,1373-1374.

¹⁶ Fernandez-Garcia M.,Mazzon M.,Jacobs M., Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* 2009;5:318-328

¹⁷ Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, 3, 13-22.

¹⁸ Fernandez-Garcia M.,Mazzon M.,Jacobs M., Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* 2009;5:318-328.

¹⁹ Proteínas estructurales ensambladas. [Consultado enero 2012]. Disponible en: http://www.viprbrc.org/brc/home.do?decorator=flavi_dengue

²⁰ Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;7:823-829.

²¹ Chen S T et al. Clec5a is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*. 2008;453:672-6.

²² Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;22:313-9

²³ Salonen A, T Ahola, L Kaariainen. Viral RNA replication in association with

cellular membranes. *Curr Top Microbiol. Immunol* 2005;285:139-173.

²⁴ Mackenzie, J. (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* 6, 967–977

²⁵ Clyde K, Kyle J, Harris E. Recent advances in Deciphering Viral Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J Virol* 2006;80:11418-11431.

²⁶ E. Perera R, Kunh R: Structural Proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008 August ; 11(4): 369–377

²⁷ Rico-Hesse, R., L. M. Harrison, R. A. Salas, D. Tovar, A. Nisalak, C. Ramos, J. Boshell, M. T. de Mesa, R. M. Nogueira, and A. T. da Rosa. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230:244–251.

²⁸ Messer, W. B., D. J. Gubler, E. Harris, K. Sivananthan, and A. M. de Silva. 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9:800–809.

²⁹ Byron M, Koraka P, Osterhaus A; Dengue virus pathogenesis: an integrated view; *clinical microb revws* 2009 22 (4)

³⁰ Wu, S. J., G. Grouard-Vogel, W. Sun, J. R. Mascola, E. Brachtel, R. Putvatana, M. K. Louder, L. Filgueira, M. A. Marovich, H. K. Wong, A. Blauvelt, G. S. Murphy, M. L. Robb, B. L. Innes, D. L. Birx, C. G. Hayes, and S. S. Frankel. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat. Med.* 6:816–820.

³¹ Durbin, A. P., M. J. Vargas, K. Wanionek, S. N. Hammond, A. Gordon, C. Rocha, A. Balmaseda, and E. Harris. 2008. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* 376:429–435.

³² Sabin, A. B. 1952. Research on dengue during World War II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1:30–50.

³³ Stephen S. Whitehead , Joseph E. Blaney , Anna P. Durbin & Brian R. Murphy Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, 5, 518-528

³⁴ Halstead SB, O'Rourke EJ. 1977b. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146:201–217.

-
- ³⁵ Mazzon M, Jones M, Davison A, Chain B, Jacobs M Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis.* 2009 Oct 15;200(8):1261-70
- ³⁶ Jordan M, Dengue virus, *Current Topics in Microbiology and immunology* 338 Edit A.L. Rothman 2010
- ³⁷ Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F. 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol J.* Sep 24;4:91.
- ³⁸ Yu CY, Hsu YW, Liao CL, Lin YL. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J Virol.* 2006;80:11868-11880.
- ³⁹ Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol.* 2006;80:2976-2986.
- ⁴⁰ Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol.* 2007;81:7136-7148.
- ⁴¹ Limjindaporn T, Wongwiwat W, Noisakran S, Srisawat C, Netsawang J, Puttikhunt C, Kasinrerk W, Avirutnan P, Thiemmecca S, Sriburi R, Sittisombut N, Malasit P, Yenichitsomanus PT. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379:196-200.
- ⁴² Warke RV, Martin KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, Bosch I. TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. *J Virol* 2008;82:555-564
- ⁴³ Geoffrey M. Cooper *The cell. A molecular approach* ed Sinauer associatesl. USA 2002. Pp 321-323.
- ⁴⁴ Jacob T, Van den Broeke C, Favoreel HW. Viral serine/threonine protein kinases. *Journal of Virology* 2011; 85(3): 1158–1173
- ⁴⁵ Brinkmann MM, Schulz TF. Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *The Journal of General Virology* 2006; 87(5): 1047–1074.

-
- ⁴⁶ Cheeran MC, Hu S, Sheng WS, Rashid A, Peterson PK, Lokensgard JR. Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection. *Journal of Neurovirology* 2005; 11(6): 512–24.
- ⁴⁷ Muñoz J, Jordan J, Sanchez-Burgos G, Laurent-Rolle M, García-Sastre A; Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *PNAS* 2003; 100 14333-14338
- ⁴⁸ Mazzone M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis.* 2009 Oct 15;200(8):1261-70
- ⁴⁹ Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanaroj S, Charoensirisuthikul T, Kasisith J. 2008. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* May 15;197(10):1459-67
 - ⁵⁰ Warke RV, Xhaja K, Martin KJ, Fournier MF, Shaw SK, et al. 2003. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol.* Nov;77(21):11822-32. Erratum in: *J Virol.* 2004 May;78(9):4947-8.
 - ⁵¹ Warke RV, Martin KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, Bosch I. 2008. TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. *J Virol.* Jan;82(1):555-64
 - ⁵² Simmons CP, Popper S, Dolocek C, Chau TN, Griffiths M, Dung NT, et al. 2007. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2007 Apr 15;195(8):1097-107.
 - ⁵³ Fink J, Gu F, Ling L, Tolfvenstam T, Olfat F, Chin KC, Aw P, George J, Kuznetsov VA, Schreiber M, Vasudevan SG, Hibberd ML Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007 Nov 21;1(2):e86
 - ⁵⁴ Sariol CA, Muñoz-Jordán JL, Abel K, Rosado LC, Pantoja P, Giavedoni L, Rodriguez IV, White LJ, Martínez M, Arana T, Kraiselburd EN. Transcriptional activation of interferon-stimulated genes but not of cytokine genes after primary infection of rhesus macaques with dengue virus type 1 *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Jun;14(6):756-66.

-
- ⁵⁵ Pattanakitsakul SN, Rungrojcharoenkit K, Kanlaya R, Sinchaikul S, Noisakran S, Chen ST, Malasit P, Thongboonkerd V. 2007. Proteomic analysis of host responses in HepG2 cells during dengue virus infection. *J Proteome Res*. Dec;6(12):4592-600.

 - ⁵⁶ Albuquerque LM, Trugilho MR, Chapeaurouge A, Jurgilas PB, Bozza PT, et al. 2009. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DiGE) analysis of plasmas from dengue fever patients. *J Proteome Res*. Dec;8(12):5431-41.

 - ⁵⁷ Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V: The ubiquitin–proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *J Proteome Res* 2010, 9:4960-4971.
 - ⁵⁸ Wilm M. (2009). Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics*. 9:4590–4605.

 - ⁵⁹ Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912–1934.

 - ⁶⁰ Iliuk A., Martin V., Alicia M., Geahlen R., Tao A. (2010). In-depth Analyses of Kinase-dependent Tyrosine Phosphoproteomes Based on Metal Ion-functionalized Soluble Nanopolymers. *Proteomics*. 9(10):2162-72

 - ⁶¹ Pan C, Olsen JV, Daub H, Mann M. Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Dec;8(12):2796-808.

 - ⁶² Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev Proteomics*. 2011 Feb;8(1):81-94.
 - ⁶³ ATCC THP1 cell line
[Consultado diciembre 2011]. Disponible en:
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=TIB-202&Template=cellBiology>

 - ⁶⁴ Gould EA, Clegg JC: Growth, titration and purification of alphaviruses and flaviviruses. In *Virology: a practical approach* Edited by: Mahy BWJ. IRL press, Oxford, U.K; 1991:43-78.

 - ⁶⁵ Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM: Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 2005, 79:4557-4567.

⁶⁶ Lopez O. Papel de la infección de la proteína NS1 en la modulación del MHC y citosinas relevantes en la respuesta al virus dengue en cultivos celulares. Tesis

⁶⁷ Trinidad JC, Thalhammer A, Specht CG, Lynn AJ, Baker PR, Schoepfer R, Burlingame AL. Quantitative analysis of synaptic phosphorylation and protein expression. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Apr;7(4):684-96.

⁶⁸ Estructura itraq reagent. Consultado enero 2012 disponible en:
<http://www.moffitt.org/ObjectRender.aspx?Path=/ContentStore/Department/332/figure.jpg>

⁶⁹ Walther TC, Mann M. (2010). Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. 190(4):491-500.

⁷⁰ Itraq consultado enero 2012. Disponible en:
<http://www.broadinstitute.org/scientificcommunity/science/platforms/proteomics/itraq>

⁷¹ Jensen et al. *Nucleic Acids Res*. 2009, 37(Database issue):D412-6

⁷² Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas PD. (2010) PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res.*, 38(Database issue):D204-10

⁷³ Mi H, Thomas P. (2009) PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol Biol.*, 563:123-40.

⁷⁴ Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000632.

⁷⁵ Saka HA, Valdivia RH. Emerging Roles for Lipid Droplets in Immunity and Host-Pathogen Interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012.

⁷⁶ Behura SK, Gomez-Machorro C, Harker BW, deBruyn B, Lovin DD, Hemme RR, Mori A, Romero-Severson J, Severson DW. Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Nov;5(11):e1385.

⁷⁷ Morchang A, Yasamut U, Netsawang J, Noisakran S, Wongwiwat W,

Songprakhon P, Srisawat C, Puttikhunt C, Kasinrerker W, Malasit P, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T. Cell death gene expression profile: role of RIPK2 in dengue virus-mediated apoptosis. *Virus Res.* 2011 Mar;156(1-2):25-34.

⁷⁸ Ellencrona K, Syed A, Johansson M. Flavivirus NS5 associates with host-cell proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and regulating synaptic membrane exocytosis-2 (RIMS2) via an internal PDZ binding mechanism. *Biol Chem.* 2009 Apr;390(4):319-23.

⁷⁹ Dengue viruses. [consultado febrero 2012] disponible en:
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>

⁸⁰ Perera R, Kunh R. Structura proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11(4) 369-377

⁸¹ Clyde K, Kyle J, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J virol* 2006, 80 (23) 11418-11431

⁸² Uniprot 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1
[Consultado febrero 2012]. Disponible en:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q99460>

⁸³ Glickman MH, Ciechanover A: The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002, 82:373-428.

⁸⁴ López T, Silva-Ayala D, López S, Arias CF. Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system. *J Virol.* 2011 Nov;85(22):11964-71

⁸⁵ Rassman A, Henke A, Zobawa M, Carlsonh M, Saluz H, Grabley S, Lottspeich F, Munder T; Proteome alterations in human host cells infected with coxsackievirus B3; *Jorunal of general virology* 2006 87, 2631-2638

⁸⁶ Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V: The ubiquitin–proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *J Proteome Res* 2010, 9:4960-4971.

⁸⁷ Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Bonazzi M, Cossart P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A: Appraising the roles of CBLL1 and the ubiquitin/proteasome system for flavivirus entry and replication. *J Virol* 2011, 85:2980-2989.

⁸⁸ Bose S, Brooks P, Mason G, RivettJ, Gamma interferon decreases the level of 26 s proteasomes and changes the pattern of fhosfhorylation. *Biochem J* (2001)

⁸⁹ Feng P, Liang C, Chin Y, Zhang W, Gravel R, Wu T, Sun R, Usherwood E, Jung J; a novel inhibitory mechanism fo mitochondrion-dependent apoptosis by herpes viral protein. *Plos Pathog* 3(12)

⁹⁰ Li J, Huang R, Liao W, Chen Z, Zhang S, Huang R.: Dengue virus utilizes calcium modulating cyclophilin-binding ligand to subvert apoptosis; *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 24;418(4):622-7.

⁹¹ Zamarin D, Garcia Sastre A, Xiao, Wang R, Palese P; Influenza Virus PB1-f2 protein induces Cell death thrugh mitochondrial ANT3 and VDAC. *Plos pathog* 2005 1(1)

⁹² Ding T, Zhang W, Ma Wenyu, Ren J; Identification of a mutated BHK -21 cell line that became less susceptible to Japanese encephalitis virus infection. *J virol* 2011 8:115

⁹³ Uniprot 14 3 3 epsilon
[Consultado febrero 2012]. Disponible en:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P62258>

⁹⁴ Pallas, D. C., H. Fu, L. C. Haehnel, W. Weller, R. J. Collier, and T. M. Roberts. 1994. Association of polyomavirus middle tumor antigen with 14- 3-3 proteins. *Science* 265:535–537.

⁹⁵ Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, arakawa Y, Hino O: Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1

⁹⁶ uniprot Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1
[Consultado febrero 2012]. Disponible en:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y6G9>

⁹⁷ Bremmer K, Scherer J, Yi J, Vershinin M, Gross S, Valle R; Adenovirus transport via direct interaction with cytoplasmic dynein qith the viral capsid hexon subunit. *Cell Host & Microb* 6, 523-535

⁹⁸ Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M. & Nigg, E. A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379–390

⁹⁹ Szebeni, A., Herrera, J. E. & Olson, M. O. (1995). Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* 34, 8037–8042.

¹⁰⁰ Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P. & Laemmli, U. K. (1991). Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and

nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* 11, 2567–2575.

¹⁰¹ Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, Kasinrerk W, Wongwiwat W, Malasit P, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res.* 2010 Feb;147(2):275-83

¹⁰² Rawlinson SM, Pryor MJ, Wright PJ, Jans DA. CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production; *J Biol Chem.* 2009 Jun 5;284(23):15589-97

¹⁰³ Uchil PD, Kumar AV, Satchidanandam V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5451-64

¹⁰⁴ Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 2012 May 1;443(3):851-6.

¹⁰⁵ Warke RV, Khaja K, Martin KJ, Fournier MF, Shaw SK, Brizuela N, de Bosch N, Lapointe D, Ennis FA, Rothman AL, Bosch I. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol.* 2003 Nov;77(21):11822-32

¹⁰⁶ Sariol CA, Muñoz-Jordán JL, Abel K, Rosado LC, Pantoja P, Giavedoni L, Rodriguez IV, White LJ, Martínez M, Arana T, Kraiselburd EN. Transcriptional activation of interferon-stimulated genes but not of cytokine genes after primary infection of rhesus macaques with dengue virus type 1. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Jun;14(6):756-66