

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR

**“Aislamiento y caracterización de exosomas producidos  
por células U937-DC-SIGN infectadas por DENV”**

Tesis

Que presenta

**Q.F.B Fernando Ruiz Jiménez**

Para obtener el grado de

**Maestro en ciencias**

en

**Infectómica y Patogénesis Molecular**

Director de Tesis:

**Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres**

Dedicatoria:

A mi madre que siempre me dio su apoyo durante la búsqueda de mi vocación, ella que siempre busco que mi felicidad y crecimiento fueran los motores que me impulsaran a llegar hasta llegara a donde estoy, ella que me enseñó a ser valiente y a enfrentarme a la adversidad, a no darme por vencido. Esas enseñanzas moldearon lo que soy ahora y el camino que voy a seguir, teniendo siempre en mi mente y en mi alma su recuerdo y cariño.

A mi abuelo pilar de mi familia, su cariño y dedicación han hecho que el cuidado de mis seres queridos sea una prioridad sin descuidar mis metas y objetivos. A mi abuela corazón de mi casa y de mi familia que con su cariño me ha ayudado a travesar los momentos más difíciles y me ha cobijado con el amor de otra madre.

A mi hermana que me ha enseñado que las personas más fuertes son las que más amor necesitan, por el valor y coraje que me ha contagiado.

Agradecimientos:

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 8 del departamento de Infectómica y patogénesis molecular a cargo de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres.

Durante el desarrollo de este trabajo el estudiante gozo del apoyo del CONACYT recibiendo la beca con número 367825.

A la Dra. Rosa María del Ángel por el recibirme en su laboratorio y el apoyo recibido durante la realización de este trabajo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A la Dra. Sofía L. Alcaraz Estrada por su guía y su consejo además del apoyo durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por los consejos y la guía tanto en los cursos previos como en el desarrollo del proyecto, así como su apoyo fuera del área académica.

A la Dra. Patricia Talamás Rohana por sus aportaciones y consejos durante el desarrollo del trabajo, así como su crítica constructiva.

A José Humberto Pérez Olais que con sus consejos aportaciones y amistad ayudaron a que todo llegara a buen puerto durante este trabajo.

A mi amiga y confidente Mariana Rodríguez que desde el primer día me oficio una sonrisa.

A mis amigos y compañeros de laboratorio y generación por las tardes de estudio y risas.

## Contenido

1.-Resumen: .....	vii
2.-Abstract:.....	x
3.-Introducción:.....	1
3.1.-Generalidades: .....	1
3.2.-Manifestaciones clínicas:.....	1
3.3.-Impacto a nivel mundial. ....	3
3.4.-Estructura del virus:.....	4
3.5.-Ciclo de replicación del virus: .....	5
3.6.-DENV, DC-SIGN y la respuesta inmune.....	8
3.7.-Exosomas: .....	10
3.8.- Características generales de los exosomas: .....	11
3.9.-Exosomas, mRNAs, miRNAs y DNA.....	12
3.10.-Exosomas y la dualidad en las infecciones virales. ....	14
4.-Hipótesis.....	16
5.-Justificación.....	16
6.-Objetivos.....	16
6.1.-Objetivo general.....	16
6.2.-Objetivos específicos. ....	17
7.-Metodología. ....	17
7.1.-Condiciones a evaluar: .....	17
7.2.-Preparación del suero para medio de cultivo.....	18
7.3.-Línea celular. ....	18
7.4.-Propagación viral. ....	18
7.5.- Infección de células U937-DC-SIGN y citometría de flujo.....	19
7.6.-Aislamiento de exosomas por centrifugación diferencial. ....	19
7.6.1.-Inmunoprecipitación.....	20

7.7.-Microscopía electrónica de transmisión.....	21
7.7.1.-Microscopia electrónica con contraste.....	21
7.8.-PAGE-SDS y tinción argéntica.....	22
7.9.-Identificación de marcadores de exosomas.....	23
7.11.- Aislamiento e Identificación de RNA contenido en el exosoma.....	24
7.11.- Ensayos de captación de exosomas.....	25
8.-Resultados.....	26
8.1.- Citometría de flujo para evaluar la infección viral.....	26
8.2.- Aislamiento de exosomas método centrifugación diferencial y reactivo Total exosome aisolation reagent.....	27
8.3.- Análisis morfológico con microscopía electrónica de transmisión.....	29
8.4.-Análisis morfológico de exosomas con microscopía electrónica de contraste.....	30
8.5.- Análisis morfológico de exosomas con ayuda de microscopía electrónica de contraste de exosomas inmunoprecipitados.....	31
8.6.-Inmunomarcaje anti CD81.....	33
8.7.-Cuantificación de proteínas de exosomas purificados y PAGE.....	33
8.8.-Cuantificación de proteínas de exosomas inmunoprecipitados y tinción argéntica.....	36
9.-Identificación de proteínas exosomales.....	37
9.1-Evaluacion de la contaminación por otras vesículas.....	38
9.2.-Identificación de marcadores exosomales.....	39
9.3.-Identificación de la histona H2B en exosomas.....	40
10.-Identificación de material genético contenido en exosomas.....	41
12.-Discusión de resultados.....	45
13.-Conclusiones:.....	49
14.-Perspectivas:.....	49
15.-Bibliografía:.....	50

## Índice de figuras:

Figura 1: Países y áreas con riesgo de transmisión del DENV.....	3
Figura 2: Células blanco del DENV durante su inoculación.....	6
Figura 3: Ciclo replicativo del DENV.....	7
Figura 4: Infección de células U937-DC-SIGN con DENV2.....	26
Figura 5: Microscopia electrónica del precipitado obtenido de la adición directa del reactivo “Total exosome isolation”.....	29
Figura 6: Microscopía electrónica de contraste de exosomas de células U937-DC-SIGN.....	30
Figura 7: Microscopia electrónica de los exosomas inmunoprecipitados.....	31
Figura 8: Microscopia electrónica de los exosomas inmunoarcados.....	33
Figura 9: Cuantificación de proteínas de exosomas purificados.....	34
Figura 10: Proteínas presentes en exosomas de células U937 DC-SIGN.....	35
Figura 11: Concentración de proteína pre y post inmunoprecipitación.....	36
Figura 12: Inmunoprecipitación y lavado de exosomas.....	37
Figura 13: Evaluación de la presencia de GRP78 en la fracción exosomal.....	38
Figura 14: Identificación de la proteína CD81 en la fracción exosomal.....	39
Figura 15: Identificación de la proteína CD63 en la fracción exosomal.....	40
Figura 16: Western Blot de la histona H2B.....	41
Figura 17: El miRNA Let-7c se sobreexpresa en exosomas de células infectadas con DENV.....	42
Figura 18: El miRNA 155 se expresa menos en exosomas de células infectadas con DENV.....	43
Figura 19: Ensayo de captación de exosomas.....	44

**Índice de tablas:**

Tabla 1: Características generales de los exosomas y su composición. .... 12

Tabla 2: Papel que juegan los exosomas en las infecciones virales. .... 15

Tabla 3: Centrifugación diferencial.. ..... 27

## 1.-Resumen:

La fiebre por Dengue es la enfermedad viral más importante transmitida por vector, produciéndose hasta cien millones de casos anualmente y aproximadamente doscientas mil muertes. Lo anterior tiene un grave impacto tanto para la salud pública como para el desarrollo económico de la población afectada. La falta de una terapia farmacológica específica y un esquema de vacunación efectivo fortalecen la necesidad de investigar los mecanismos patogénicos de la enfermedad. Durante la infección por Dengue (DENV) se liberan a la sangre una gran cantidad de mediadores solubles que regulan la comunicación celular y la respuesta inmune, sin embargo, poco se ha descrito acerca de la comunicación mediada por cuerpos vesiculares, en especial los exosomas. Se sabe que los exosomas juegan un papel dual durante las infecciones virales ya sea promoviendo una respuesta que ayude a eliminar al agente infeccioso o participando activamente en la evasión de la respuesta del huésped. Por lo anterior, nos planteamos como objetivo analizar el contenido de los exosomas producidos por células U937 DC-SIGN infectadas por DENV. Los exosomas son cuerpos vesiculares de entre 30 y 100 nm que son secretados por la célula y contienen proteínas y material genético, estas vesículas son participes de la comunicación celular. En una primera fase nos enfocamos principalmente en el contenido de microRNAs. Después de realizar diversas centrifugaciones diferenciales e inmunoprecipitaciones purificamos los exosomas de células infectadas y no infectadas con el DENV, observando que el miRNA let-7c se encuentra sobreexpresado en exosomas de células infectadas. Por el contrario, la expresión del miR-155 se encuentra disminuida en exosomas de células infectadas, todo esto 24 horas posteriores a la infección. Los miRNAs identificados están relacionados a vías de respuesta antiviral. Así, let-7c promueve la eliminación del virus al tener como blanco a BACH-1 y HO-1 involucradas en respuesta anti estrés oxidativo, mientras que miR-155 está involucrado en la señalización por interferón. Por otro lado, también se investigó la presencia de la histona H2B en exosomas proteína que interacciona con los ácidos nucleicos y la cual se ha reportado previamente en los exosomas. El conocer cuáles son los miRNAs transportados en los exosomas y los cambios

en la expresión génica que estos exosomas producen nos permitirá comprender que mensajes transmite la célula infectada a las demás células y su efecto en la patogénesis de la enfermedad.

## **2.-Abstract:**

Dengue fever is the most important vector borne viral disease with one hundred million cases and approximately 200,000 deaths each year. This disease has a huge economic impact on public health but also on the economic development of the affected population. The lack of a specific pharmacological therapy and an effective vaccination scheme strengthens the need to investigate the pathogenic mechanisms of the disease. During Dengue infection (DENV) the secretion of a great amount of soluble mediators to the bloodstream occur; these molecules regulate cellular communication and immune response, however, little is known about the communication mediated by vesicular bodies, especially the exosomes.

It is known that exosomes play a dual role during many viral infections either promoting a response that helps to eliminate the infectious agent or actively participating in the evasion of the host response. Therefore, the aim of this work was to analyze the contents of exosomes produced by DC-SIGN U937 cells infected with DENV. In the first phase we focus mainly on the content of microRNAs. After conducting various centrifugations and immunoprecipitations exosomes from DC-SIGN U937 infected and uninfected cells were purified. We observed that the miRNA let-7c is overexpressed in exosomes from DENV infected cells. Moreover, expression of miR-155 is decreased in exosomes from infected cells, this 24 hours after infection. The identified miRNAs are related to antiviral response pathways, let-7c promotes elimination of the virus targeting BACH-1 and HO-1, proteins involved in oxidative stress response whereas anti miR-155 is involved in interferon signaling. Knowing what miRNAs are transported in exosomes and the changes in their expression can help us to understand the message that infected cell transmits to other cells and what kind of response will be carried out in the receiving cell

### **3.-Introducción:**

#### **3.1.-Generalidades:**

La enfermedad febril llamada Dengue es causada por un virus homónimo conocido como Virus Dengue (DENV) perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Existen 4 serotipos distinguibles (DENV 1-4) que al parecer proceden de la región selvática del sudeste asiático, aunque actualmente se presentan casos de la enfermedad en gran parte del mundo [1]. Este hecho se debe en parte al cambio en los patrones de movilidad del ser humano que llevan a personas infectadas de regiones endémicas, a países o regiones que comúnmente se encuentran libres de la enfermedad [2]. El DENV depende para su transmisión de un vector artrópodo: el mosquito hematófago *Aedes aegypti* que tiene una amplia distribución mundial en climas tropicales y subtropicales a excepción de la Antártida. El virus puede también ser transmitido a través de mosquitos *Aedes albopictus* en zonas como las cercanas al océano Índico y América del Sur [2].

#### **3.2.-Manifestaciones clínicas:**

La infección por DENV se produce cuando el mosquito portador del virus se alimenta de la sangre del huésped humano. Posterior a este proceso, se inicia la incubación del virus dentro del huésped que comprende un periodo de 3 a 15 días (con una media de 5 a 8 días) después de lo cual comienza un periodo febril. A continuación, se describen de manera breve las etapas por las que cursa el paciente infectado por DENV y sus manifestaciones clínicas.

#### Fase febril:

En esta fase, cuya duración aproximada es de entre 2 a 7 días, la fiebre a menudo se acompaña por enrojecimiento facial, eritema en la piel, dolor corporal generalizado, dolor muscular, dolor articular y dolores de cabeza. Se ha reportado que algunos pacientes pueden sufrir de garganta irritada, enrojecimiento en la faringe o en la conjuntiva; también son comunes otros síntomas como la anorexia, la náusea y el vómito. El dengue, así como muchas otras enfermedades, puede confundirse pues produce síntomas que son comunes para diversas patologías, lo que dificulta un diagnóstico oportuno.

Se pueden presentar síntomas de carácter hemorrágico como lo son las petequias o el sangrado de la membrana mucosa como la nariz o encías, episodios de sangrado vaginal masivo en mujeres en edad reproductiva e incluso sangrado de origen gastrointestinal, aunque estos últimos son menos comunes en esta fase.

#### Fase crítica:

En esta fase se produce un estado de leucopenia progresiva seguida de un descenso rápido en el número de plaquetas que ocurre como antesala a la fuga de plasma. En esta etapa, los pacientes que no cursan con un incremento de la permeabilidad vascular, mejoran, mientras que aquellos pacientes con alteraciones en la permeabilidad vascular, empeoran debido a la pérdida progresiva de plasma. Si el paciente sobrevive el periodo de 24 a 48 horas que comprende la fase crítica se produce una reabsorción progresiva de los fluidos extravasculares en un lapso de 48 a 72 horas que lleva a un proceso de recuperación.

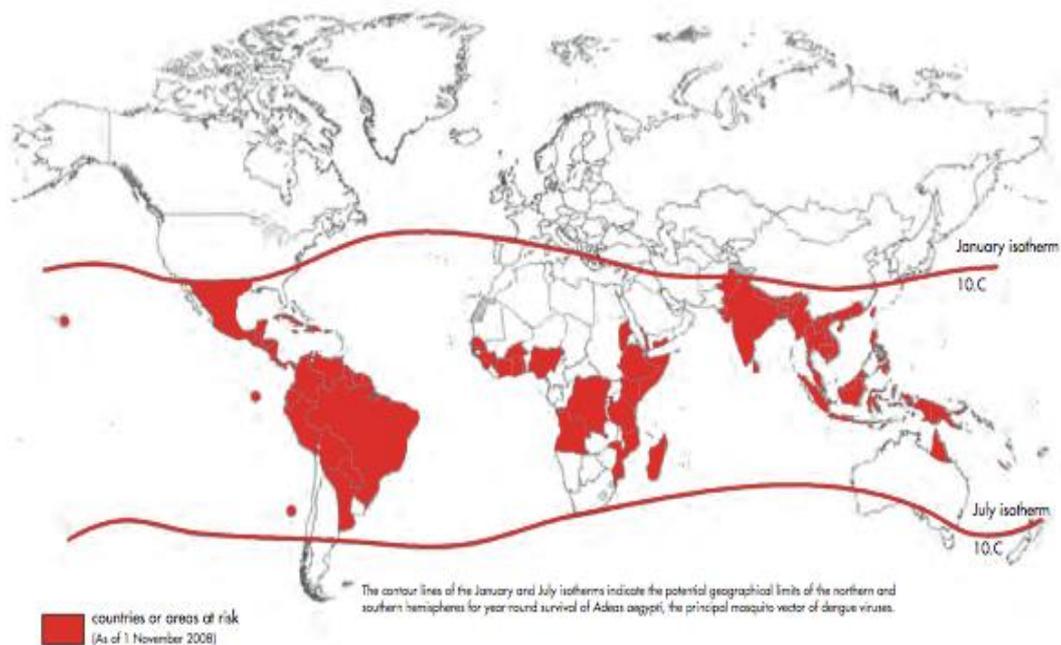
#### Dengue severo:

El dengue severo se define por uno o más de los siguientes parámetros: 1) Fuga de plasma que puede tener como desenlace un estado de shock (shock por dengue), la acumulación de fluidos también puede estar presente con o sin la

presencia de dificultad respiratoria; 2) sangrado profuso; 3) disminución en la función orgánica. A medida que se promueve un incremento en la permeabilidad vascular, la hipovolemia empeora y se llega al estado de shock.

### 3.3.-Impacto a nivel mundial.

Se estima que actualmente en al menos 100 países la enfermedad del dengue es endémica, e ellos habitan un estimado de 2,500 millones de personas las cuales están en riesgo de contraer la enfermedad (Figura 1). Cada año se presentan entre 50 y 100 millones de infecciones por dengue, dentro de estos infectados 500,000 presentan el cuadro de fiebre hemorrágica por dengue y se presentan un promedio de 22,000 muertes principalmente en infantes. [4] En el caso particular de México en lo que va del año (revisado hasta la semana 34) se han registrado un total de 10,910 casos de dengue de los cuales 3,255 pertenecen al dengue hemorrágico. [5]



**Figura 1.- Países y áreas con riesgo de transmisión del dengue.** En el área con color rojo se muestran los países en los que el riesgo de transmisión está presente. [3]

### 3.4.-Estructura del virus:

Los viriones de DENV tienen una simetría icosaédrica con un diámetro de aproximadamente 500 Å, cuenta con un núcleo electrodens rodeado por una bicapa lipídica y una superficie relativamente lisa. [6]

El genoma se compone por una cadena sencilla de RNA de sentido positivo de aproximadamente 10,700 nucleótidos con un solo marco de lectura abierto que codifica para una poli proteína que a su vez da lugar a 3 proteínas estructurales: cápside (C de 100 aminoácidos), membrana (M de 75 aminoácidos), y envoltura (E e3 495 aminoácidos) que forman la partícula viral y 7 proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS5A, NS5B [6] [7].

En el extremo 5' el RNA viral cuenta con un cap tipo 1 similar al de los mRNAs celulares; debido a lo cual, el material genético del virus es traducido por un mecanismo dependiente de cap que comienza con un escaneo en la región 5'UTR.

En el extremo 3' carece de una cola de poli-A pero cuenta con una estructura tallo-burbuja. Ambos extremos tanto el 5'UTR como el 3'UTR son indispensables para una correcta traducción y replicación [7].

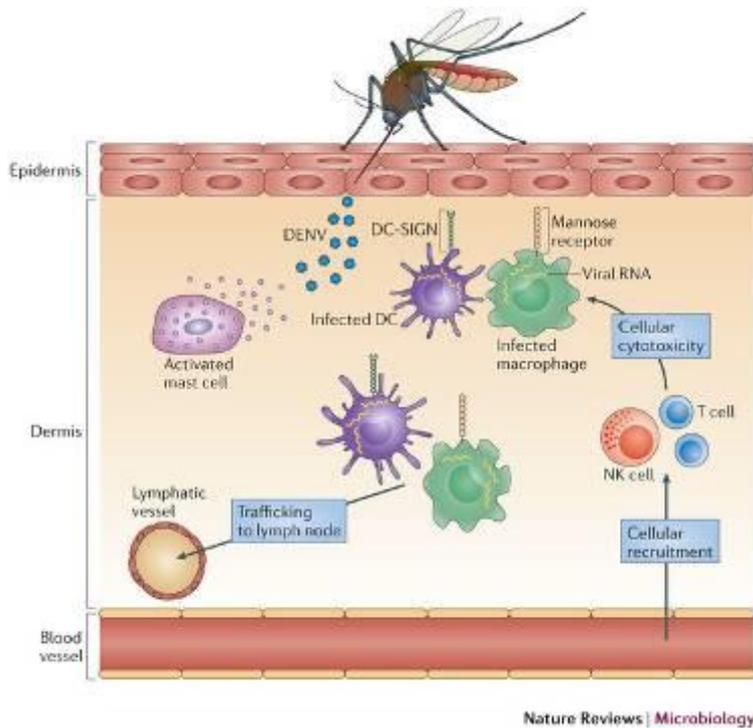
Ahondando en la estructura del virus, encontramos que la nucleocápside del virus está rodeada por una membrana lipídica que proviene del huésped, en esta membrana están embebidas dos proteínas estructurales previamente mencionadas: la glicoproteína E y la proteína M. La proteína M encontrada en los viriones maduros es solo un fragmento producto del procesamiento proteolítico de la proteína prM y está anclada a la membrana viral por dos hélices transmembranales. Así mismo, en los viriones maduros se puede encontrar la glicoproteína E que está acomodada en 90 homodímeros con sets de tres homodímeros de E, orientados a modo cabeza cola que se encuentran en 30 balsas formando un patrón de espina de pescado [6][8]. En las partículas inmaduras la glicoproteína E está asociada con la proteína prM y tres de estos

heterodímeros dan lugar a una espícula viral. La maduración de las partículas virales ocurre durante el egreso de las partículas virales al medio extracelular.

### 3.5.-Ciclo de replicación del virus:

La infección del virus a las principales células blanco, trátase de células dendríticas inmaduras o macrófagos, comienza con la interacción ligando-receptor. La proteína E del virus es la encargada de llevar a cabo la interacción con la célula huésped a través de diversas moléculas que actúan como receptores y que promueven la internalización del virus. Entre éstas moléculas se encuentra el heparán sulfato que sirve como un elemento que lleva a cabo interacciones de baja afinidad con diversos flavivirus. Las interacciones de baja afinidad cumplen un papel como concentradoras del virus en la superficie celular aumentando la probabilidad de encontrar el receptor adecuado para su internalización.

Además del heparán sulfato se han descrito una variedad de factores que están involucrados en la interacción virus-célula como las proteínas de choque térmico HSP 70 y HSP 90, neolactatotetraosilceramida, CD14, GRP78, el receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa, y lectinas del tipo C como DC-SIGN (del inglés; dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin) o el receptor de manosa [1][8].



**Figura 2.- Células blanco del DENV durante su inoculación.** Las células dendríticas poseedoras del receptor DC-SIGN y los macrófagos con el receptor de manosa son de las primeras células en ser infectadas. [9]

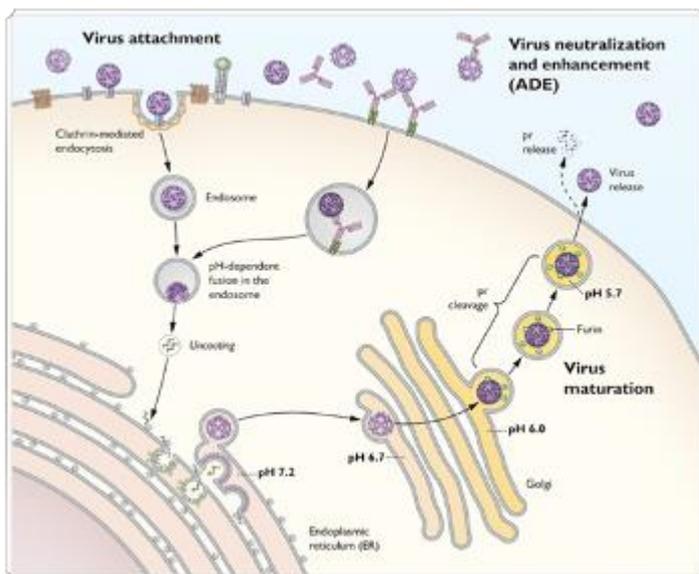
Una vez que el virus interacciona con su receptor, éste es internalizado por un mecanismo de endocitosis mediado por clatrina, en donde el virus se posiciona sobre pozos de clatrina preexistentes que posteriormente se convierten en una invaginación en la membrana y son estranguladas por la proteína dinamina formando de este modo una vesícula cubierta por clatrina. Cuando el virus se encuentra dentro de la vesícula se transporta al citosol lejos de la membrana plasmática y pierde el recubrimiento de clatrina. La vesícula endocítica es llevada a los endosomas tempranos que a su vez maduran en endosomas tardíos. Dentro de los endosomas tardíos se produce un descenso del pH interno propiciando los cambios conformacionales necesarios en la proteína E para que se lleve a cabo la fusión de membranas y la consiguiente liberación del material genético en el citoplasma.

Posterior a la liberación del material genético, empieza la traducción de las proteínas virales, en donde la poliproteína recién producida es procesada por

proteasas celulares y virales. Durante la replicación de DENV ocurren diversos cambios en la célula huésped, dentro de estos, el más común es la inducción de estructuras membranosas que proveen un ambiente propicio para la síntesis de RNA y la morfogénesis de los nuevos virus, en donde participan las proteínas no estructurales. La replicación de muchos de los virus de RNA de polaridad positiva está ligada a estructuras membranosas que alojan a los complejos de replicación.

La replicación sucede en dos pasos; en primer lugar, la cadena de RNA de polaridad positiva es copiada a una cadena de polaridad negativa que después servirá como molde para sintetizar múltiples copias de cadena positiva.

Una vez que se han sintetizado las cadenas con polaridad positiva y ya realizada la síntesis de proteínas estructurales, comienza el ensamblaje de nuevos viriones conocidos como inmaduros. El paso final de la maduración de DENV requiere del corte de la prM por la furina para exponer las regiones necesarias para la interacción ligando-receptor [8].



**Figura 3: Ciclo replicativo de DENV.** Para completar su ciclo viral dentro de la célula huésped se llevan a cabo los siguientes pasos: entrada, fusión y

desensamble, traducción y replicación, ensamblaje de nuevos virus, maduración y finalmente liberación del virus maduro.

Las partículas virales inmaduras se consideran no infectivas ya que se ha observado que la presencia de la proteína prM afecta de manera negativa la interacción virus-receptor, por tanto, para la infectividad del virión se requiere el procesamiento del precursor prM.

Interesantemente, se ha descrito que algunos de los anticuerpos generados durante una infección primaria, que reconocen a prM, son capaces de “rescatar” la infectividad del virión inmaduro gracias a la unión de la región cristalizante de los anticuerpos con el receptor Fc- $\gamma$ . Esta interacción también ocurre en infecciones secundarias con los anticuerpos generados contra la proteína E del serotipo que llevó a cabo la infección primaria, lo que permite la internalización de complejos inmunes con DENV. A éste proceso se le conoce como potenciación de la infección dependiente de anticuerpos o ADE (por sus siglas en inglés Antibody-dependent enhancement).

### 3.6.-DENV, DC-SIGN y la respuesta inmune.

Como se mencionó previamente, las células dendríticas inmaduras son un blanco importante del DENV y es aquí en donde se lleva a cabo una parte de la producción del virus. La interacción del virus con la célula dendrítica ocurre gracias a las fracciones de polisacárido presentes en la glicoproteína E y la proteína DC-SIGN. En un modelo experimental de células dendríticas inmaduras derivadas de células mononucleares de sangre periférica se mostró que en el serotipo 1 de DENV la interacción con DC-SIGN tiene un mayor impacto en la infectividad que en DENV 2, sin embargo, también se ha observado que ninguno de los serotipos tiene un impacto importante sobre la dependencia del virus a DC-SIGN.

Este trabajo toma relevancia al mostrar que aún las partículas virales inmaduras pueden ser internalizadas gracias a la ayuda de la lectina DC-SIGN potenciando de este modo la capacidad infectiva del virus. [10]

Como se mencionó previamente, las células de la respuesta inmune son un blanco importante del virus al entrar al huésped, en esta categoría se encuentran los macrófagos que juegan un papel preponderante en el esparcimiento del virus y que están involucrados en el aumento de la permeabilidad vascular asociada a la fiebre hemorrágica del dengue y al síndrome de shock por dengue [11].

Además de la activación de las células dendríticas el reclutamiento del linaje de monocitos–macrófagos también es un componente clave en la primera línea de defensa para controlar la invasión viral además de una amplia variedad de procesos celulares para detectar y responder a los patógenos. La respuesta inmune innata que se activa en estas células consiste en una serie de mecanismos que reconocen y activan a las células para responder ante el estímulo extraño. Un grupo clave de moléculas son los Receptores de Reconocimiento a Patógenos (PRR) ya que inician la detección de los flavivirus. Entre estas moléculas censoras encontramos al receptor tipo toll 3 (TLR3 por sus siglas en inglés) y el TLR 7 que reconoce el RNA de doble cadena (dsRNA) intracelular. Otras moléculas como son el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) y el gen asociado a la diferenciación del melanoma 5 (MDA-5) también son capaces de censar al virus dentro de la célula activando mecanismos efectores de la inmunidad como son la producción de óxido nítrico, la fagocitosis de los virus y la secreción de citocinas como TNF. Finalmente, es de importancia mencionar que hay otros mecanismos de inmunidad y comunicación celular que no están basados en las vías clásicas, (secreción de citosinas) o de exosomas, que son pequeñas vesículas que comunican a las células y que acarrean una variedad de moléculas que funcionan como señalizadores.

### 3.7.-Exosomas:

La célula cuenta con múltiples compartimentos que le permiten realizar sus funciones vitales, clásicamente se conocen como orgánulos y en su mayoría son intracelulares, sin embargo, se han identificado un grupo de cuerpos vesiculares extracelulares conocidos como exosomas, shedding microvesicles (SMV) y perlas apoptóticas (Apoptotic blebs)[12].

Los exosomas se descubrieron en un cultivo de reticulocitos (glóbulos rojos que no han alcanzado la madurez), y su génesis se basa en la gemación interna de las membranas endosomales que resulta en la acumulación de vesículas intraluminales (ILV: intraluminal vesicles) dentro de grandes cuerpos multivesiculares (MVB: multivesicular bodies). Las proteínas transmembranales se incorporan durante la invaginación de la membrana mientras que el contenido citosólico es vertido dentro las ILV.

Con base en sus características bioquímicas, los MBV intracelulares pueden ser destinados a diferentes caminos como son: dirección hacia los lisosomas para sufrir un proceso de degradación o realizar la migración hacia la membrana plasmática en donde estas vesículas se fusionan y son capaces de liberar su contenido al medio extracelular. Las vesículas intraluminales liberadas en el exterior celular es lo que conocemos como exosomas. Aunque se han descrito ambos destinos para los MVB se desconoce si existen dos clases de MBV o si las ILV existen dentro de las MBV.

Debido a que los exosomas contienen proteínas endosomales, de membrana plasmática o de citosol y muy pocas de otros orgánulos como podrían ser las mitocondrias o el aparato de Golgi, se estableció que estas vesículas pertenecen a un compartimento intracelular específico y no contienen proteínas al azar ni son detritos celulares. Hasta la fecha los exosomas son los únicos cuerpos de origen vesicular que tienen su génesis en un compartimento intracelular; específicamente de los MVBs [12] [13].

La biogénesis de los exosomas requiere del complejo ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport ). ESCRT consiste en cuatro complejos además de proteínas asociadas. El ESCRT-0 es responsable del agrupamiento de la carga en un mecanismo dependiente de ubiquitina, ESCRT I y ESCRT II inducen la formación del cuerpo gemante, SCRTIII induce la escisión de la vesícula y otras proteínas accesorias (especialmente la ATPasa VSP4) que permiten el desensamble de la maquinaria SCRT. Lo mencionado anteriormente toma importancia al encontrarse que miembros de la familia SCRT como son ALIX o TSG101 aparecen de manera abundante en estudios de exosomas llegando incluso a ser tomados como marcadores para la diferenciación de los mismos. Otras moléculas que se encuentran enriquecidas en los MVB y por lo tanto en los exosomas son las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9 que también se usan como marcadores para su identificación. [13]

### 3.8.- Características generales de los exosomas:

Los exosomas al ser liberados cumplen con diversas funciones con base en los elementos que transportan, por ejemplo, en exosomas provenientes de células de la respuesta inmune pueden contener proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de tipo 2 (MHC II) que ayudarán a las células receptoras en el proceso de presentación antigénica. (Tabla 1) [14] [15]

Para llevar a cabo su función los exosomas se valen de diferentes mecanismos. Las proteínas membranales de los exosomas interactúan con la célula blanco de una manera yuxtacrina (dependiente de contacto), del mismo modo proteínas de la membrana pueden ser escindidas para formar fragmentos que activen al receptor adecuado. Por otro lado, los exosomas se pueden fusionar con la membrana de la célula blanco para incorporar RNA o proteínas, así como el contenido lipídico del cuerpo vesicular, por ejemplo, el ácido araquidónico. [12]

**Tabla 1: Características generales de los exosomas y su composición.** Los exosomas poseen características distintivas tanto en su morfología como en su composición. Entre estas características se encuentra el tamaño de entre 30 y 100 nm, su composición rica en lípidos presentes en balsas lipídicas y la presencia de tetraspaninas [12] [13] [14].

<b>Exosomas</b>	
<b>Tamaño (diámetro)</b>	30-100 nm
<b>Densidad de flotación</b>	1.10-1.21 gr/ cm <sup>3</sup>
<b>Morfología</b>	Forma de copa, aunque no es esencial.
<b>Composición lipídica</b>	LBPA (ácido lisobisfosfatidico), baja exposición de fosfatidilserina, colesterol, ceramida, balsas lipídicas, esfingomielina.
<b>Marcadores proteicos</b>	Alix, TSG101, HSP70, CD63, CD81, CD9
<b>Sitio de origen</b>	Cuerpos multivesiculares.
<b>Modo de liberación extracelular</b>	Constitutiva y regulada.
<b>Mecanismo de descarga</b>	Exocitosis de los MVB.
<b>Contenido</b>	Proteínas , miRNA y mRNA.

### 3.9.-Exosomas, mRNAs, miRNAs y DNA.

Como se estableció previamente los exosomas son un medio de transporte para diversos componentes celulares entre los que se encuentra el material genético ya sea DNA o RNA. El RNA contenido dentro de los exosomas está compuesto

de una mezcla heterogénea de especies, en su mayoría mRNA y miRNA con poca o nula presencia de RNA ribosomal. La presencia de mRNAs dentro de los exosomas habla de la transferencia horizontal de material genético entre las células y del cambio de fenotipo al sintetizar proteínas que previamente no estaban presentes en la célula. Se han identificado hasta 1300 transcritos de mRNA que corresponden a un 8% del total de mRNAs de la célula donadora. [16]

Además de los mRNAs, los exosomas contienen diversas especies de miRNAs. En un estudio que tuvo como objetivo el mapeo de miRNAs procedentes de exosomas se lograron identificar 943 de los 2233 miRNAs maduros conocidos. Los exosomas contienen una población enriquecida de miRNAs que puede ser usada para monitorear el estado de una célula e incluso pueden ocuparse como biomarcadores para determinar el curso de una patología. [17]

Más recientemente se ha logrado identificar DNA de doble cadena tanto en el interior como en el exterior de los exosomas. Éste, representa el DNA genómico completo y en él se pueden identificar mutaciones de la célula parental. Se ha observado que los exosomas pueden transportar fragmentos mayores a 10 Kb de DNA de doble cadena además de DNA mitocondrial y pequeñas cantidades de DNA de cadena sencilla. Como se mencionó previamente, el contenido exosomal puede representar el estado del genoma celular ya que contiene fragmentos de los cromosomas de la célula parental. Aunado a todo lo anterior se han logrado identificar mutaciones en genes como p53 y KRAS en el DNA contenido en los exosomas provenientes de células cancerosas lo que fortalece la idea que los exosomas representan el estado celular y pueden servir como biomarcadores en la búsqueda y seguimiento en la progresión de las enfermedades. [18] [19]

### 3.10.-Exosomas y la dualidad en las infecciones virales.

Además de funcionar como mediadores en la comunicación celular en condiciones asépticas, se ha demostrado que los exosomas son vehículos en los que viajan moléculas que promueven la inmunidad frente a patógenos. Este hecho quedó confirmado en experimentos en los cuales se retó a un tipo celular como un cultivo primario de trofoblastos humanos con el virus vaccinia (vv) o el virus de la estomatitis vesicular (VSV); el estímulo del patógeno promovió la secreción de exosomas que confieren cierto grado de resistencia a la infección a las células que los reciben. Esta resistencia es en parte atribuida a un cúmulo de miRNAs conocida como (C19MC) que favorecen la autofagia, una respuesta típica para eliminación de patógenos intracelulares [20].

Continuando con las evidencias de que los exosomas tienen funciones de protección contra infecciones se demostró que células de la línea H9 CD4+ son capaces de secretar a la citidina desaminasa APOBEC3G, una proteína con potente actividad antiviral. En ese estudio se observó que las células H9 secretan dentro de los exosomas una forma enzimáticamente activa de APOBEC3G que dificulta la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en las células receptoras. Esta resistencia a la infección se evaluó por la presencia de las proteínas virales Gag, p24 y vif así como la presencia de pocas copias de productos de la retrotranscripción del VIH. Sin embargo, debido a que las células productoras de exosomas con APOBEC3G (células T activadas) son también el blanco de la infección por VIH, la secreción de esta enzima se ve disminuida y la protección conferida se ve obstaculizada. [21]

Además de las proteínas en el interior de los exosomas, las proteínas en la membrana exosomal también juegan un papel protector en la célula receptora. Células infectadas por DENV son capaces de secretar a las proteínas IFITIM especialmente IFITIM-3, que es capaz de bloquear la fusión de membranas entre el virus y la célula con lo que bloquea la infección. [22]

Finalmente, en el otro lado de la moneda tenemos a patógenos que ven favorecido su proceso patogénico gracias a los exosomas, como es el caso del virus de la hepatitis C. En este caso el virus de la hepatitis C (HCV) utiliza la maquinaria de biogénesis y secreción de exosomas para poder infectar a otras células de manera eficiente e incluso evadir parcialmente a la respuesta inmune mediada por anticuerpos neutralizantes. El virus empaqueta su genoma de RNA dentro de los exosomas y como el exosoma no cuenta con las proteínas de envoltura del virus, la neutralización por los anticuerpos se ve obstaculizada [23].

**Tabla 2. Papel que juegan los exosomas en las infecciones virales.** Los exosomas juegan un papel tanto positivo como negativo en las infecciones virales; por un lado pueden transportar en su interior proteínas o material genético que le dé una ventaja a la célula frente al patógeno. [20] [21] [22] [23]

Exosomas				
Célula	Virus	Papel de los exosomas	Contenido	Mecanismo
Trofoblastos placenta	Vaccinia	Protector	miRNA	Cumulo miRNA C19MC promueve autofagia.
Trofoblastos placenta	VSV	Protector	miRNA	Cumulo miRNA C19MC promueve autofagia.
Linfocitos TCD4	VIH	Protector	Proteínas	Citidina Desaminasa APOBEC3G hipermuta el genoma viral.
Monocitos	Dengue	Protector	Proteínas	IFITM3 bloquea la fusión de membranas entre el huésped y el virus.
Huh7	HCV	Involucrado en la patogenia	Genoma viral	El virus evade la respuesta inmune al proteger su material genético dentro de los exosomas.

#### **4.-Hipótesis.**

Las células U937 DC-SIGN al ser expuestas a la infección por DENV secretan exosomas que contiene proteínas y RNA capaces de alertar a otras células sobre el patógeno.

#### **5.-Justificación.**

El dengue al ser la infección viral transmitida por vector más importante del mundo, tiene amplias repercusiones en la salud pública, así como un gran impacto económico. Este hecho, aunado a la falta de una vacuna y de un tratamiento anti-viral específico hace necesario entender los mecanismos que se disparan durante una infección para así desarrollar alternativas terapéuticas para el control de la enfermedad.

Como se mencionó previamente, los exosomas son mediadores de la comunicación intercelular e incluso pueden jugar un papel importante tanto en la protección contra las infecciones virales como en la patogenia de las mismas. Por tanto, es de importancia el estudio de su papel en la infección por DENV identificando posibles agentes con los que la inmunidad combate la infección con una aproximación que puede o no involucrar los mediadores clásicos (citocinas o quimiocinas) o estudiando cómo los exosomas pudieran participar en la patogenia de la enfermedad.

#### **6.-Objetivos.**

##### **6.1.-Objetivo general.**

Aislar e identificar el contenido de proteínas y RNA de exosomas secretados por células U937-DC-SIGN en respuesta a la infección por DENV.

## 6.2.-Objetivos específicos.

- Aislar exosomas de células U937-DC-SIGN no infectadas e infectadas con DENV.
- Identificar a las proteínas contenidas dentro de los exosomas secretados por las células U937 durante la infección por DENV.
- Identificar los miRNA y mRNA presentes en los exosomas en el contexto de la infección por DENV.

## 7.-Metodología.

### 7.1.-Condiciones a evaluar:

- Células U937-DC-SIGN expuestas a DENV2 Nueva Guinea a una multiplicidad de infección de 3 (M.O.I de 3) en medio completo para células U937 diferenciadas durante un periodo de 2 h.
- Células U937-DC-SIGN Mock expuestas al medio completo para células U937 diferenciadas.
- Células U937-DC-SIGN con a medio completo para células U937 diferenciadas como control.

## 7.2.-Preparación del suero para medio de cultivo.

Dado que los exosomas se encuentran en una gran cantidad de fluidos de origen biológico es necesario eliminarlos del suero fetal que se utilizará para el cultivo de las células U937. Para ello, el suero una vez inactivado se centrifugó a  $110,000 \times g$  por 2 h en el rotor SW 28 [24]. La pastilla de exosomas del suero fue eliminada y el suero sin exosomas se usó para la preparación de medio de cultivo.

## 7.3.-Línea celular.

Las células U937 que expresan el receptor DC-SIGN transfectado establemente con el plásmido pcDNA3 con el promotor de citomegalovirus se mantuvo en suspensión con el medio de cultivo compuesto por RPMI Advance, SFB 5%, penicilina/estreptomicina 2x, glutamina 2x, fungizona (anfotericina B). Se indujo la diferenciación de las células U937 ( $6 \times 10^6$  células /ml) con 5 ng/ml of phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA) por 72 h. [25]. Una vez que las células se diferenciaron y adhirieron a la caja de cultivo se infectaron con DENV.

## 7.4.-Propagación viral.

El virus se propagó en ratones neonatos de la cepa CD-1. Brevemente, a los ratones lactantes se les inoculó con DENV 2 cepa Nueva Guinea, se dejó que la infección siguiera su curso natural hasta observar síntomas neurológicos. Una vez que se presentó la sintomatología clásica (poca motilidad, caquexia, temblores, letargia), se procedió al sacrificio de los animales congelándolos a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se almacenaron para su posterior almacenamiento y procesamiento, el cerebro fue extraído por succión con la ayuda de una jeringa, posteriormente, se maceró y se agregó un tercio de su volumen de medio Hanks (Gibco, Life technologies). Se realizaron centrifugaciones sucesivas a 14 000 rpm en la centrifuga Mirko R ) para eliminar los componentes no solubles para finalmente filtrar a través de una unidad Millex de  $0.22 \mu\text{m}$  y alicuotar el filtrado. Para obtener el material usado en la infección simulada (Mock) se siguió el mismo

procedimiento, sin embargo, en lugar de inocular DENV en los ratones neonatos se les inoculó solución de Hanks.

#### 7.5.- Infección de células U937-DC-SIGN y citometría de flujo.

Se eligió la multiplicidad de infección (MOI) de 3 para infectar un cultivo de células U937 previamente diferenciadas con PMA. Las células se incubaron a 37°C con DENV 2 o con la infección simulada (MOCK) por 2h con solución Hanks (Gibco, Life Technologies) para posteriormente retirar la infección e incubar durante 24 h. La eficiencia de esta infección se determinó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal (denominado 4G2) que reconoce a la proteína E en la superficie del virus.

Las células infectadas se recuperaron de la caja de cultivo con la ayuda de un scrapper y se colocaron en suspensión en una solución de PBS 1x con un pH de 7.4. Posteriormente, las células se centrifugaron a una velocidad de 800 rpm y se lavaron de nuevo con PBS 1x, se continuó el tratamiento de las células con solución fijadora de paraformaldehído al 1% para preservar la integridad de las mismas. A continuación, las células se permeabilizaron con una solución que contiene el detergente saponina (saponina al 0.2 %, suero fetal bovino al 1% y PBS 1x). Este paso de permeabilización permitió la entrada del anticuerpo 4G2 a la célula para el marcaje de la proteína viral dentro de la célula huésped. Posterior a la adición del anticuerpo 4G2 se lavó con solución permeabilizadora para después adicionar el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 488 que permitió la detección en el citómetro de flujo Fortessa de Becton Dickinson (BD).

#### 7.6.-Aislamiento de exosomas por centrifugación diferencial.

El medio de cultivo de las células no infectadas e infectadas, se centrifugó a 300x g por 60 min para remover las células y los fragmentos celulares. [26] [27]. El medio libre de células se pasó a un nuevo tubo sin agitar la pastilla. Posteriormente, se sometió a centrifugaciones sucesivas. La primera

centrifugación fue a 2000 x *g* durante 20 min (centrifuga Mikro 22R). A continuación, el sobrenadante se centrifugó a 12,200 x *g* durante 40 min (rotor JA25.50), posteriormente, se pasó por un filtro de 0.2 micras (Millex-GS 0.22 µm Thermo scientific) y finalmente se procedió a empastillar los exosomas a 120000 x *g* durante 70 min (rotor SW41 Ti). [28]

Al volumen recolectado de las centrifugaciones se le agregaron 0.5 volúmenes del reactivo "Total exosome isolation". Posteriormente, se mezcló con la ayuda de un vortex o pipeteando de manera ascendente y descendente hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.

Las muestras se incubaron durante toda la noche entre 2 y 8 °C. Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron a 10,000 x *g* por una hora de 2 a 8° C. Se aspiraron y descartaron los sobrenadantes y los exosomas quedaron contenidos en la pastilla, en el fondo del tubo.

#### 7.6.1.-Inmunoprecipitación.

Se acopló el anticuerpo de elección (CD81 o CD63) a las perlas magnéticas (Exosome immunoprecipitation protein A, Invitrogen) a una concentración de 10 µg diluido en PBS Tween al 0.01% mediante rotación por 10 min a temperatura ambiente para posteriormente colocar el imán y remover el sobrenadante. A las perlas resultantes (perlas-ab) se les colocaron 200 µl de PBS Tween 20.

Una vez que se tenían las perlas-ab, se les agregaron 180 µl de exosomas purificados y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min con rotación. Las perlas se separaron nuevamente con la ayuda de un imán, eliminando el sobrenadante. A continuación, las perlas se lavaron 3 veces con 200 µl de PBS y se transfirieron a un tubo nuevo. Finalmente, se eluyó la muestra de las perlas agregando 20 µl de glicina pH 2.8 e incubando 2 min a temperatura ambiente. Para recuperar la muestra, fue necesario colocar el imán y recolectar el sobrenadante.

## 7.7.-Microscopía electrónica de transmisión.

Para confirmar la presencia de exosomas en la pastilla obtenida por ambos métodos se analizó el tamaño de las partículas aisladas mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, los exosomas aislados fueron resuspendidos en una solución que contiene glutaraldehído a una concentración del 2.5%, cloruro de calcio 5 mM y cacodilato de sodio 0.1 M. Se lavó 3 veces con PBS a 1800 rpm por 4 min.

Posteriormente, se procedió a fijar con una solución que contiene OsO<sub>4</sub> al 1%, ferrocianuro de potasio al 1.5% en cacodilato 0.1 M por 25 min. Se lavó rápidamente 2 veces con agua para quitar sales y después 3 veces con PBS. Se procedió a deshidratar consecutivamente con alcohol en un intervalo de concentraciones que van del 50%, 70% y 90% durante 10 min cada uno y posteriormente 2 veces más con etanol al 100% por 10 min.

Se retiró el etanol y se colocó óxido de propileno, después de lo cual se procedió a una pre inclusión en polybed - alcohol 1:1 por toda la noche, posterior a esto se realizó otra pre inclusión en polybed – alcohol 2:1 por una 1.5 hrs.

A continuación, se hicieron 2 cambios de resina pura, se polimerizaron en capsulas BEEM a 60° C toda la noche y se contrastó con acetato de uranilo al 5% en una solución de metanol al 50% por 18 min y finalmente en plomo Reynolds por 2 min.

Una vez realizado el procedimiento se observaron con el microscopio electrónico (JEOL JEM 1011, JEOL Ltd Tokio).

### 7.7.1.-Microscopia electrónica con contraste.

En un papel parafilm se colocó una gota del purificado de exosomas o el equivalente a 10  $\mu$ g de proteína de exosomas intactos resuspendidos en PBS.

Con la ayuda de unos fórceps se colocó una rejilla de níquel cubierta con carbón formvar en la gota y se incubó por 30 a 60 min. Se aseguró que la rejilla estaba posicionada con la cubierta de carbón hacia la gota de exosomas.

Después se lavó la rejilla 3 veces con PBS absorbiendo el exceso con papel absorbente. Se fijó la muestra con paraformaldehído al 2% colocando una gota del fijador sobre papel parafilm y se colocó la rejilla sobre la gota por 10 min, posterior a esto se lavó de nuevo con PBS 3 veces.

Para realizar el inmunomarcaje se puso en contacto con la rejilla 30  $\mu$ L de anticuerpo primario (CD 63 o CD 81) a una dilución 1:50 y se incubó durante 40 minutos. Se lavó la rejilla 3 veces con PBS adicionado con suero fetal bovino al 0.1%.

Para realizar el marcaje con anticuerpo secundario acoplado a oro de 15 nm, se pusieron en contacto 30  $\mu$ l del anticuerpo sobre la rejilla y se incubó por 40 min. Posterior a eso, se fijó con glutaraldehído al 2.5% incubando durante 10 min seguido de 5 lavados con agua deionizada. Se contrastó la muestra con acetato de uranilo al 2% colocándolo en la rejilla por 15 min seguido de una incubación de 10 min con metilcelulosa al 0.13% y acetato de uranilo al 0.4%. Finalmente, se removió el exceso de líquido con un papel absorbente y se secó al aire por 5 min. [26]

#### 7.8.-PAGE-SDS y tinción argéntica.

Previo a la preparación de la electroforesis se lisaron las vesículas con la ayuda del sonicador Sonics Vibra Cell con 3 ciclos de 1 min con el posterior paso de la muestra por nitrógeno líquido y agua en ebullición, este paso se repitió 3 veces. Posterior a la lisis de las vesículas, se cuantificó el contenido proteico con el reactivo BCA (Pierce BCA Proteina Assay kit). Brevemente, se mezclaron 5 partes de la solución A por cada parte de la solución B, se colocaron 0.1 ml de la muestra con 2 ml de la solución A+B, se incubó durante 30 min a 37°C y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Una vez

concluido el tratamiento de la muestra se corrieron geles de poliacrilamida-SDS en gradiente abarcando las concentraciones de 10%,13% y 16%. Para la separación de las proteínas exosomales, se utilizó una corriente de 70 V por 2 h.

La tinción argéntica se realizó con la siguiente metodología: se fijó el gel durante 30 min con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 5%, se dió un lavado de 15 min en una solución de metanol al 50% seguido de un lavado de 15 min en agua. Se sensibilizó el gel con una solución de tiosulfato de sodio al 0.01% seguido de dos lavados con agua mQ. Posteriormente, se trató con una solución de nitrato de plata al 0.1% para finalizar con una solución de revelado con carbonato sódico y formalina al 2%.

#### 7.9.-Identificación de marcadores de exosomas.

El segundo método que se usó para garantizar la identidad de los exosomas presentes en la pastilla obtenida por centrifugación diferencial o por el reactivo Exopure, fue la identificación de marcadores específicos de exosomas. Para ello, las proteínas presentes en los exosomas aislados se separaron en geles SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-húmeda en presencia de buffer de transferencia a 17 volts por 45 min. La membrana fue bloqueada con una solución de PBS mas leche al 10% y posteriormente incubada con anticuerpos anti CD63 (Abcam ab8219) a una dilución 1:500 y CD81(Abcam ab79559) a una dilución 1:2000 o anticuerpos H2B (Abcam ab 52484) en una dilución 1:8000. Posteriormente, la membrana se incubó con un segundo anticuerpo HRP y las proteínas detectadas fueron reveladas por quimioluminiscencia. (SuperSignal West Femto)

### 7.11.- Aislamiento e Identificación de RNA contenido en el exosoma.

Se aisló el RNA contenido en los exosomas usando Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Invitrogen). La extracción se basa en el principio de fenol ácido/ cloroformo. En primer lugar, la muestra de exosomas purificados se llevó a un volumen de 200 µl utilizando PBS 1x, se le agregaron 200 µl de la solución de desnaturalización (proporcionada en el kit) y se incubó por 5 min en hielo. Posteriormente, se le agregaron 400 µl de fenol-ácido: cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 10,000x g a temperatura ambiente. Finalmente, se recuperó la fase acuosa donde estaban los transcritos.

Para aislar el RNAm y obtener una fracción enriquecida de los miRNAs, a la fase acuosa se le agregó 2/3 del volumen de etanol al 100%, se colocó en una columna y se centrifugó. La mayoría de los miRNAs pasaron a través de la columna sin inmovilizarse. Esta fracción se recuperó, se le agregó más etanol (700 µl) y se volvió a pasar a través de una segunda columna donde se inmovilizaron los miRNAs. De esta forma se tuvieron dos columnas, una con el RNAm inmovilizado y otra con los miRNAs inmovilizados. Cada columna se lavó con 700 µl de la solución de lavado 1 y se repitió la centrifugación. Posteriormente, se le agregaron 500 µl de la solución de lavado 2/3 y se repitió la centrifugación. Este último lavado se repitió una segunda vez. Los RNA se eluyeron con agua libre de nucleasas precalentada a 95°C.

Se realizó PCR con retrotranscripción para amplificar los miRNAs y posteriormente se realizó PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de los genes contenidos dentro de los exosomas. Brevemente, se colocaron 7 µL de master mix por cada 5 µL de RNA, se mezcló y centrifugó hasta llevar la solución al fondo del tubo, se adicionaron 3 µL del primer RT y se incubó en hielo durante 5 min y posteriormente se aplicó el siguiente esquema: 30 min a 16 °C, 30 min a 42°C 5 min a 85°C. Una vez concluida la PCR para retrotranscripción se agregaron 17.67 µL de mezcla TaqMan 2X Universal PCR Mater Mix-Agua libre de nucleasas. Se transfirió 1 µL de mezcla TaqMan 20x Micro RNA a un tubo para PCR y se transfirieron 1.33 µl del producto de PCR. Finalmente, se dispensaron 20 µL de Master mix para PCR ya incluyendo el producto de PCR,

una vez con la mezcla colocada en una placa para PCR se prosiguieron con 40 ciclos de 15 min a 95°C seguidos de 60 seg a 60°C. Una vez concluida la PCR se prosiguió a analizar las curvas de amplificación con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 7.11.- Ensayos de captación de exosomas.

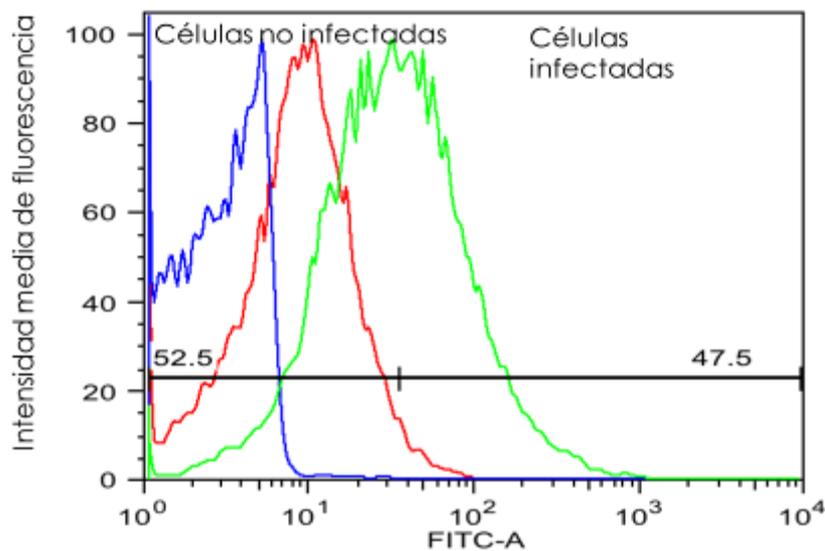
Células de la línea Huh7 se crecieron en placas de 24 pozos sobre un cubre objetos de vidrio hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80 % y se trataron con las siguientes condiciones: control sin Dil ni exosomas, 20  $\mu\text{g}$  de albumina con 5  $\mu\text{l}$  de Dil a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 40  $\mu\text{g}$  de exosomas con 5  $\mu\text{l}$  de Dil incubadas a 4°C durante 30 min, 40  $\mu\text{g}$  de exosomas con 5  $\mu\text{l}$  de Dil a 4°C durante 30 min posteriormente a 37°C por 30 min. Una vez que se concluyó el tiempo de incubación, se fijaron las células con PFA al 2% durante 20 min a 4°C. Se dieron 3 lavados de PBS para posteriormente colocar 2  $\mu\text{l}$  de VECTASHIELD con DAPI (Vector Labs) y montar los cubreobjetos sobre portaobjetos. Se analizó con la ayuda del microscopio confocal. [28], [29], [30], [31].

## 8.-Resultados

### 8.1.- Citometría de flujo para evaluar la infección viral.

La infección por DENV en las células U937 DC-SIGN, se evaluó la técnica de citometría de flujo que permite contabilizar la población de interés, seleccionadas gracias al marcaje de una o varias proteínas específicas, este caso la proteína E del virus.

La Figura 4 muestra el resultado del análisis por citometría de flujo de células no infectadas (mock, rojo), de células infectadas(verde) y del control negativo correspondiente a las células sin el anticuerpo primario.



**Figura 4.- Infección de células U937-DC-SIGN con DENV2.** Las células U937 DC-SIGN no infectadas (Mock) (roja) o infectadas con DENV2 (verde) por 24 hrs fueron analizadas mediante citometría de flujo en ausencia (azul) o en presencia del anticuerpo monoclonal 4G2(dil 1:100) (roja y verde) y un segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a Alexa 488 (1:200).

Como puede observarse, las células por sí mismas, presentaron una fluorescencia basal baja (curva azul) (Figura 4), la cual contrasta con las células

Mock incubadas con los dos anticuerpos (curva roja). La citometría muestra que bajo las condiciones de infección establecidas, esto es a una MOI de 3, se tiene un 47.5 % de células infectadas a las 24 hrs (curva verde). Este nivel de infección fue adecuado para continuar con el proceso de aislamiento y purificación de exosomas

## 8.2.- Aislamiento de exosomas método centrifugación diferencial y reactivo Total exosome isolation reagent.

Una vez que se confirmó la infección de las células por citometría de flujo, se procedió a llevar a cabo el protocolo de centrifugación diferencial y la extracción de exosomas mediante el reactivo “Total exosome isolation reagent”. Este procedimiento permitió obtener una pastilla visible de exosomas para ser recolectada al final de procedimiento.

**Tabla 3. Centrifugación diferencial para la purificación de exosomas.** Se realizaron una serie de centrifugaciones en ausencia y en presencia de reactivo de aislamiento de exosomas, según se describe en la sección de Materiales y Métodos. La eliminación de cuerpos vesiculares contaminantes es crucial para evitar contaminación en los exosomas. Se muestran las diferentes fases del proceso y su fundamento

Paso de la purificación:	Descripción
 <p data-bbox="448 1570 695 1603">2000 x g, 20 min</p>	<p data-bbox="810 1621 1353 1816">En este paso se eliminan las células muertas dejando el medio libre de los componentes con tamaño de micrómetros.</p>

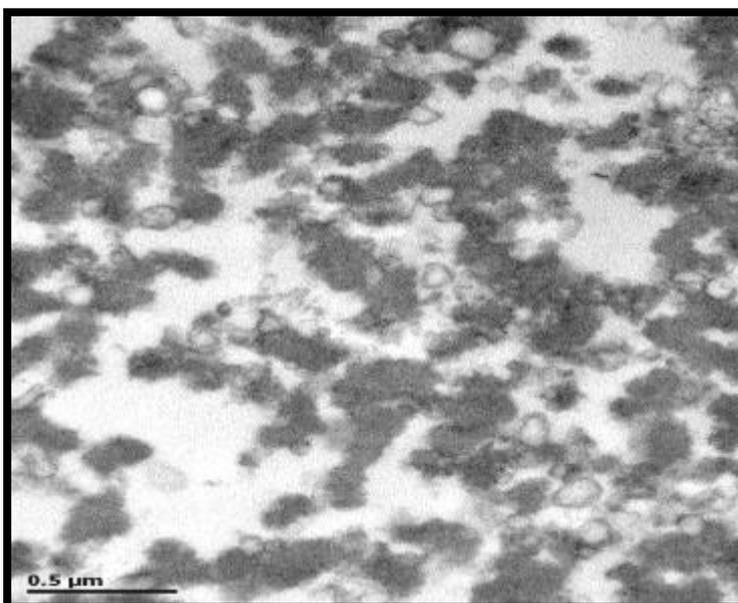
	<p>12200 x g, 40 min</p>	<p>En este paso se eliminan los cuerpos apoptoticos y elementos de tamaño cercano a 1 micrómetro.</p>
	<p>120,000x g, 70 min</p>	<p>Posterior a la centrifugación se filtra el medio para eliminar elementos mayores a los 200 nanómetros, estos elementos son conocidos como microvesículas. Al final obtenemos una lenticula que contiene los exosomas.</p>
		<p>Al agregar el reactivo Total exosome isolation reagent, se absorbe el agua de los componentes menos solubles precipitando de este modo los componentes vesiculares.</p>
	<p>10,000 x g, 1 hr</p>	<p>Al final del procedimiento se obtiene una pastilla visible de exosomas.</p>

Como se describe en la Tabla 3, los pasos de centrifugación tienen como objetivo eliminar de la mezcla todos los componentes vesiculares ajenos a los exosomas y que se convierten en una fuente de contaminación en estudios posteriores

debido a su contenido de proteínas y material genético dificultando la identificación de su procedencia.

### 8.3.- Análisis morfológico con microscopía electrónica de transmisión.

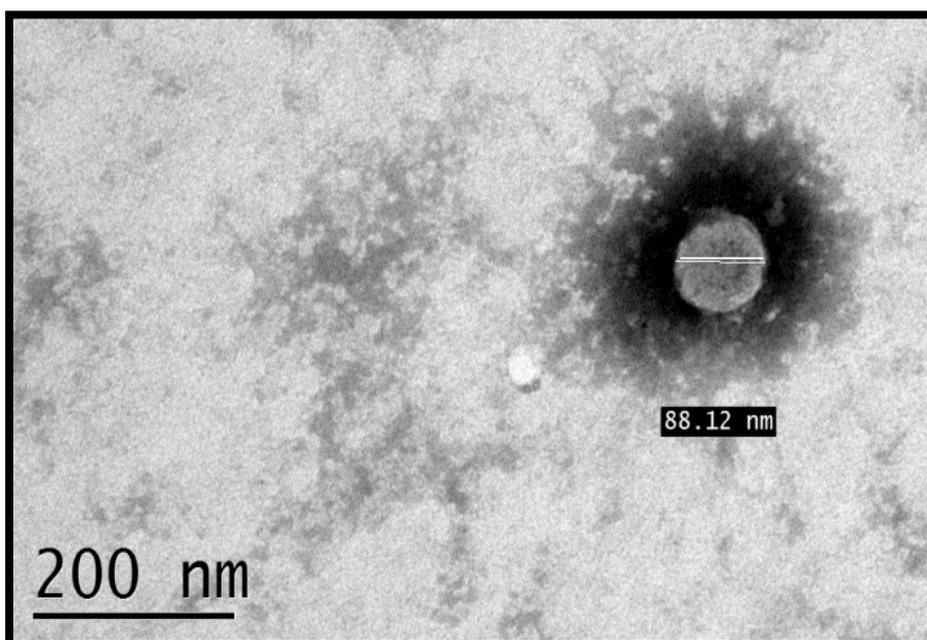
Uno de los parámetros que permite la identificación de los exosomas es la caracterización morfológica, por esa razón, después de haber usado la precipitación con el reactivo “Total exosome isolation reagent”, decidimos realizar la observación por microscopía electrónica del material aislado (Figura 5). En la preparación se encontraron una gran cantidad de cuerpos electrodensos y poco contenido vesicular. El material electrodensso impedía la observación adecuada de los exosomas.



**Figura 5.- Microscopía electrónica del precipitado obtenido de la adición directa del reactivo “Total exosome isolation”.** Se observa una gran cantidad de contenido electrodensso y estructuras poco diferenciadas que dificultan la identificación morfológica de los exosomas.

#### 8.4.-Análisis morfológico de exosomas con microscopía electrónica de contraste.

Con la idea de obtener una preparación más pura y eliminar el material electrodensito se añadió a la metodología un pretratamiento con centrifugación diferencial (Tabla 3). Bajo estas nuevas condiciones, se logró tener una preparación más homogénea de cuerpos vesiculares. Los exosomas se describen típicamente como cuerpos con forma de copa, aunque un mejor acercamiento es identificarlos como entidades pleomorfas de un tamaño entre 30 y 100 nanómetros. Así, se logró observar por microscopía electrónica cuerpos vesiculares con un tamaño de 88.12 nm, que correlaciona con el esperado de entre 30 a 100 nm. El contraste con ácido fosfotúngstico permitió definir la presencia de una membrana exterior que lo diferencia del medio (Figura 6).

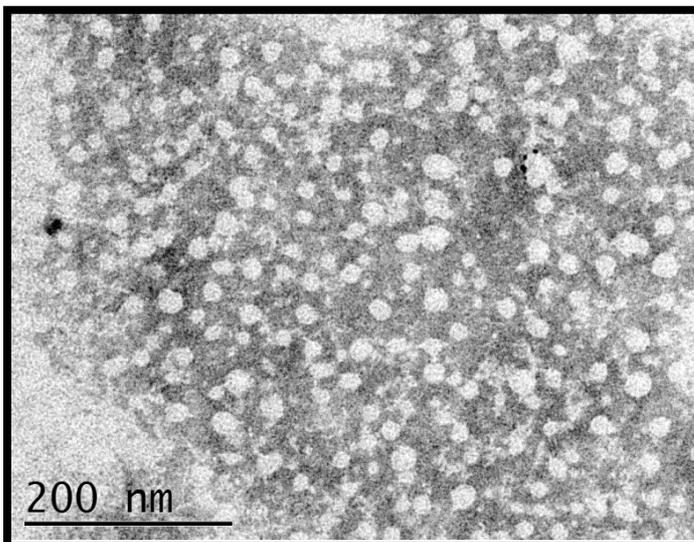


**Figura 6. Microscopía electrónica de contraste de exosomas de células U937-DC-SIGN.** Los exosomas se han descrito como entidades pleomorfas con un tamaño típico de entre 30 y 100 nm. En la preparación de exosomas se identificaron vesículas como la aquí mostrada, con un tamaño de 88.12 nm. La acumulación del agente de contrastante en el exterior de la vesícula permite la observación del cuerpo.

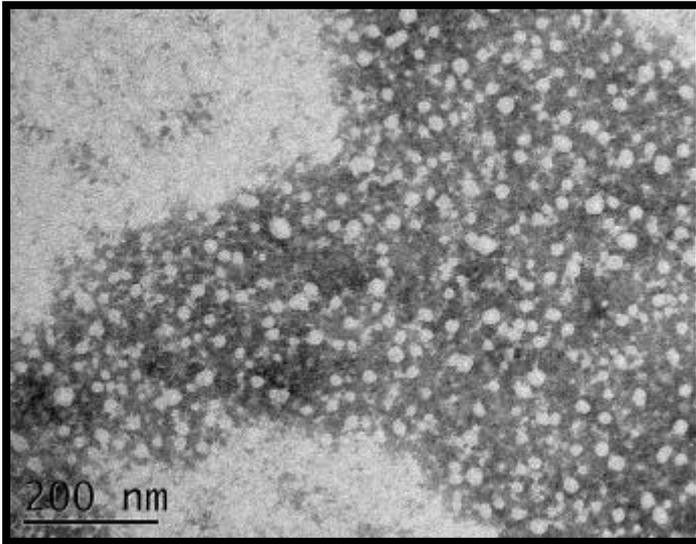
### 8.5.- Análisis morfológico de exosomas con ayuda de microscopía electrónica de contraste de exosomas inmunoprecipitados.

La inmunoprecipitación es una herramienta de gran utilidad para separar componentes específicos en una mezcla compleja, en este caso se utilizaron perlas magnéticas específicas para exosomas acopladas al anticuerpo anti CD81. La figura 7 muestra que después de realizar la inmunoprecipitación, se enriqueció una población de vesículas con tamaño y morfología homogénea, lo que nos sugiere que la selección específica de la mezcla contiene a los exosomas.

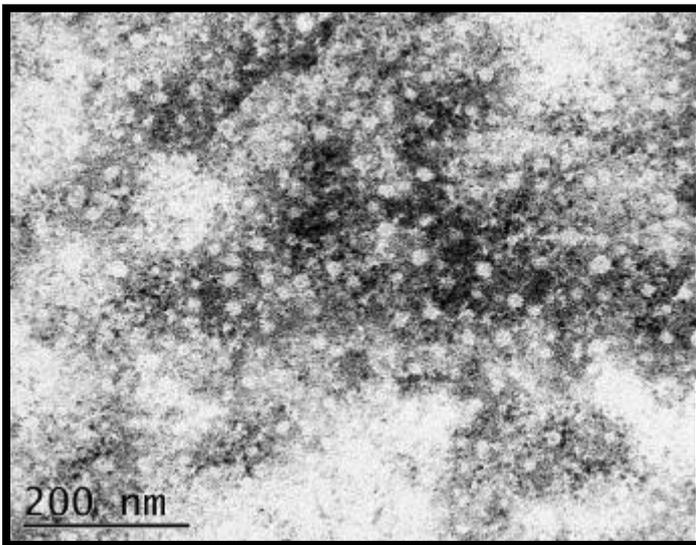
**A**



**B**



**C**



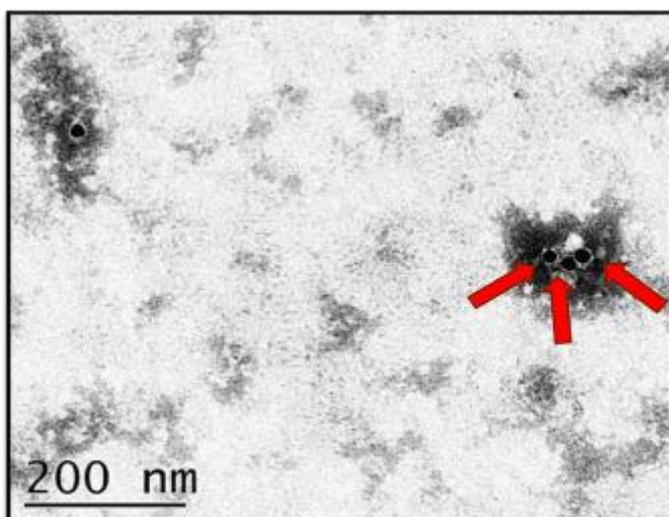
**Figura 7.-Microscopia electrónica de los exosomas inmunoprecipitados**

(A). Mediante ensayos de inmunoprecipitación, las preparaciones de exosomas mostraron una serie de vesículas homogéneas en tamaño y forma (A, B y C).

Marca cada cuadro como A, B y C.

## 8.6.-Inmunomarcaje anti CD81.

Además de la técnica de inmutprecipitación, el inmunomarcaje da la posibilidad de confirmar que las estructuras aisladas (Figura 7), son efectivamente exosomas. Por esta razón se realizó un inmunomarcaje de las vesículas aisladas mediante marcaje con anticuerpos anti-CD81, una proteína marcadora de exosomas. Empleando esta estrategia logramos observar que la marca de oro teñía las estructuras que previamente habíamos identificado como exosomas por su tamaño (Figura 8). Las partículas de oro se arreglaron de manera ordenada alrededor de una vesícula

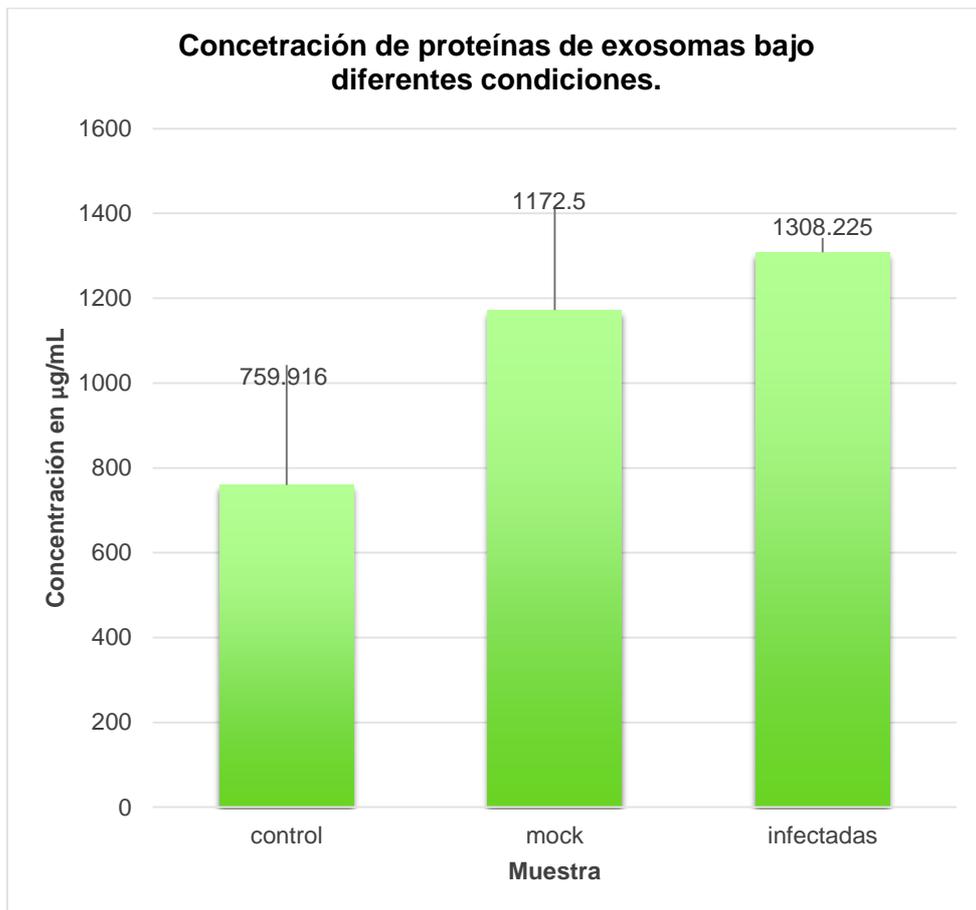


**Figura 8.-Microscopia electrónica de los exosomas inmunomarcados.** La preparación de exosomas se incubó con anticuerpos anti-CD81 (dil 1:50) y a continuación con un segundo anticuerpo acoplado a oro coloidal (dil 1:50). Las partículas de oro formaron cúmulos discretos sobre las vesículas aisladas. Las flechas rojas indican las partículas de oro coloidal unidas a la vesícula.

## 8.7.-Cuantificación de proteínas de exosomas purificados y PAGE.

Una vez confirmada la presencia de exosomas en la preparación, tanto por criterios morfológicos como inmunológico, se procedió a estimar la concentración

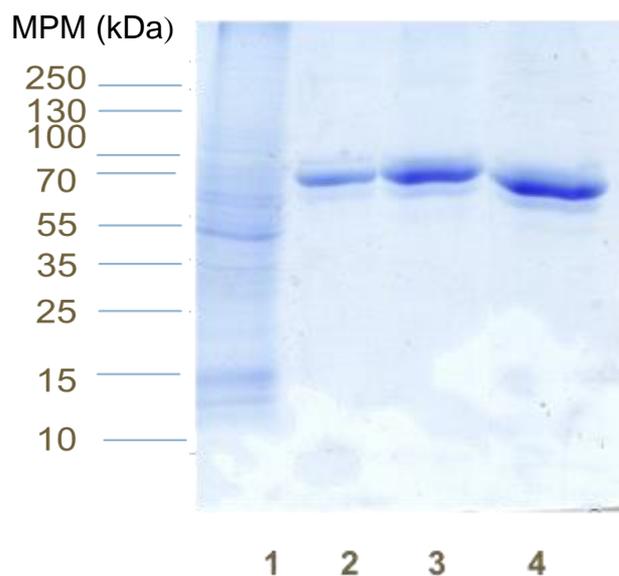
de exosomas en la muestra. Un método directo para cuantifica los exosomas es su observación por medio del detector NanoSighth, un instrumento que cuantifica entidades de un tamaño específico y reporta una concentración en una escala de  $10^x$  y esta concentración depende directamente de la célula de origen y del formato de recolección de medio. Sin embargo, debido a la falta del equipo, se realizó una aproximación indirecta de la concentración de exosomas basándose únicamente en la concentración de proteínas de la muestra. Como se muestra en la figura 9, la cuantificación de proteína indicó que había una mayor concentración de proteínas en los exosomas de las células Mock e infectadas con el DENV con respecto a las células sin ningún tratamiento (Figura 9).



**Figura 9. Cuantificación de proteínas en exosomas purificados.** La concentración de proteína de los exosomas purificados, mediante el método de

BCA se tomó como parámetro para estimar la concentración de exosomas en la muestra. La grafica presenta el promedio +/- SD de tres experimentos diferentes.

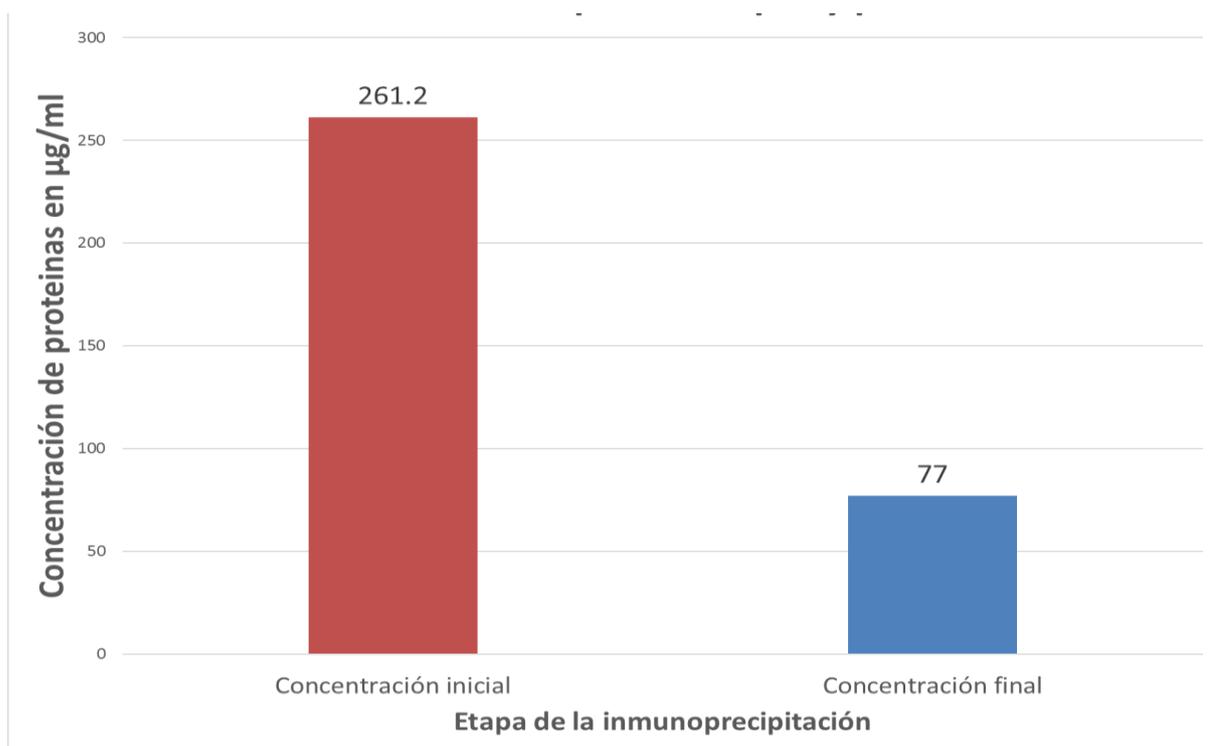
Una vez que se determinó la presencia de proteínas en los extractos exosomales se realizó un análisis electroforético mediante geles de poliacrilamida-SDS y tinción con coomasie. Aunque se esperaba ver un patrón de bandeado que abarcara varios pesos moleculares, solo se observó una banda cercana a los 70 kDa que parecía ser el componente mayoritario de la muestra. La presencia de esta sola banda no era un indicador definitivo de que solo un grupo de proteínas estuviera presente en la muestra ya que la concentración de las demás proteínas pudiera ser insuficiente para ser detectadas por el agente revelador.



**Figura 10. Proteínas presentes en exosomas de células U937 DC-SIGN.** Las proteínas purificadas de extractos celulares totales de células U937-DC-SIGN(1) o de los exosomas aislados de células control (2) Mock (3) e infectadas con DENV 2 se separaron mediante electroforesis en PAGE-SDS y se tiñeron con azul de coomasie. La migración de los marcadores de peso molecular se muestra a la izquierda de la figura

### 8.8.-Cuantificación de proteínas de exosomas inmunoprecipitados y tinción argéntica.

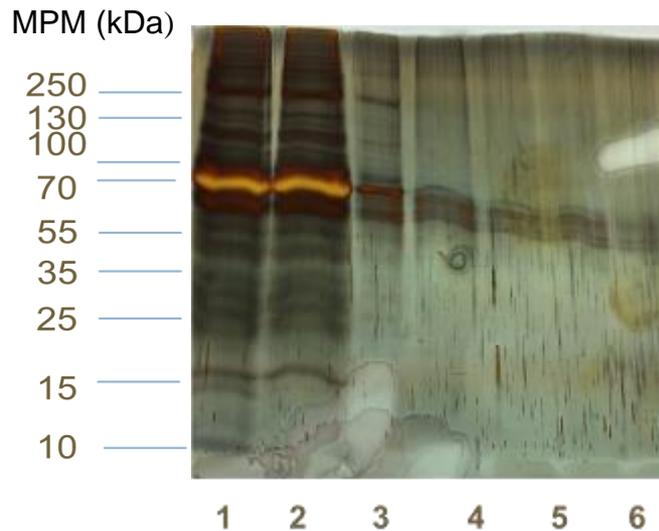
Además de la cuantificación de proteína, se determinó el rendimiento del ensayo de purificación de exosomas. El proceso de purificación de exosomas llevó a la obtención de una fracción con una concentración de 77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo la cantidad de proteína inicial 261 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esto nos habla de que se recupera solo el treinta por ciento de la concentración inicial de proteínas (Figura 11).



**Figura 11. Concentración de proteína pre y post inmunoprecipitación.**

La concentración de proteínas en la fracción exosomal purificada disminuye hasta un 70% posterior al tratamiento con las perlas magnéticas indicando la pérdida de proteínas contaminantes o de uniones inespecíficas con los exosomas que son eliminados durante los lavados, posibilidad que se refuerza con los resultados de la microscopía electrónica.

La eliminación de proteínas contaminantes de la fracción exosomal después de la inmunoprecipitación se confirmó mediante tinción argéntica. Así confirmamos que cada lavado de la inmunoprecipitación nos permite eliminar componentes contaminantes (Figura 12)



**Figura 12. Inmunoprecipitación y lavado de exosomas.** Las proteínas presentes en la fracción de exosomas obtenidos por centrifugación (1), los lavados de la fracción inmunoprecipitada (2-5) y la fracción eluida, con glicina (6) pH 2.8. se sometieron a un análisis por PAGE-SDS en un gel de poliacrilamida en gradiente teñido con plata. Las migraciones de los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda del gel.

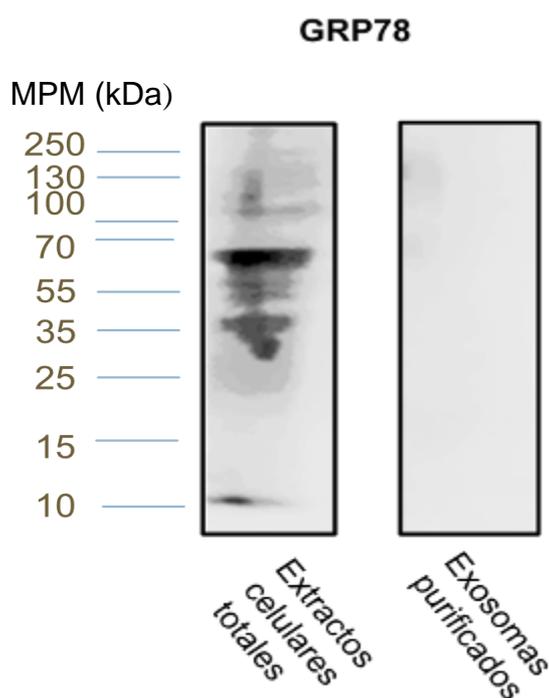
### 9.-Identificación de proteínas exosomales.

Un modo adicional a la microscopía electrónica e inmunomarcaje para validar que la fracción obtenida contenía efectivamente exosomas, fue analizando la presencia de algunas proteínas marcadores de exosomas y de otras que no deberían estar presentes en la fracción exosomal. Para ello, se evaluó la presencia de la proteína GRP78, una molécula residente del retículo endoplásmico, que, a pesar de estar enriquecida en las fracciones membranosas celulares, debería estar ausente en exosomas. En segundo lugar, se evaluó la presencia de los marcadores de exosomas clásicos, las tetraspaninas CD81 y CD63, finalmente se evaluó la presencia de la histona H2B, una proteína que se

ha reportado previamente en exosomas producidos por diversas líneas celulares y bajo estímulos diferentes.

#### 9.1-Evaluación de la contaminación por otras vesículas.

Para evaluar la pureza del extracto exosomal se analizó la presencia de la proteína de retículo GRP78. Como puede observarse en la Figura 13, la proteína se detectó en las fracciones de extractos celulares totales, pero no así en la fracción de exosomas purificados, lo que indica que la preparación de exosomas no está contaminada con fracción membranosa celular.

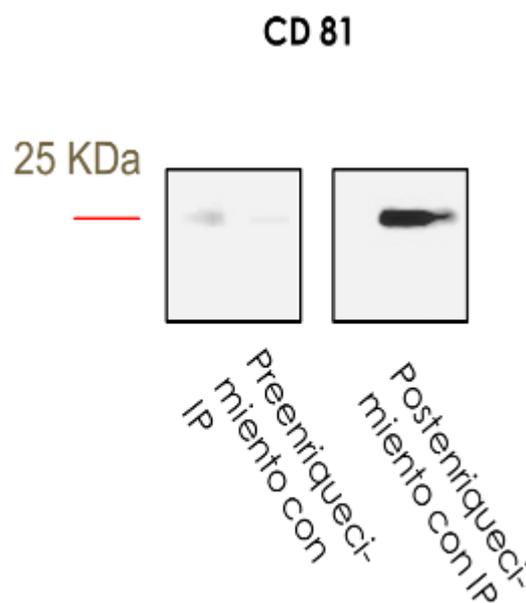


**Figura 13. Evaluación de la presencia de GRP78 en la fracción exosomal.**

Las proteínas presentes en el extracto celular total y en la fracción exosomal purificada se sometieron a análisis por Western blot empleando anticuerpos anti-GRP78, una proteína residente de retículo endoplásmico. La migración del marcador de peso molecular se muestra del lado izquierdo de la figura.

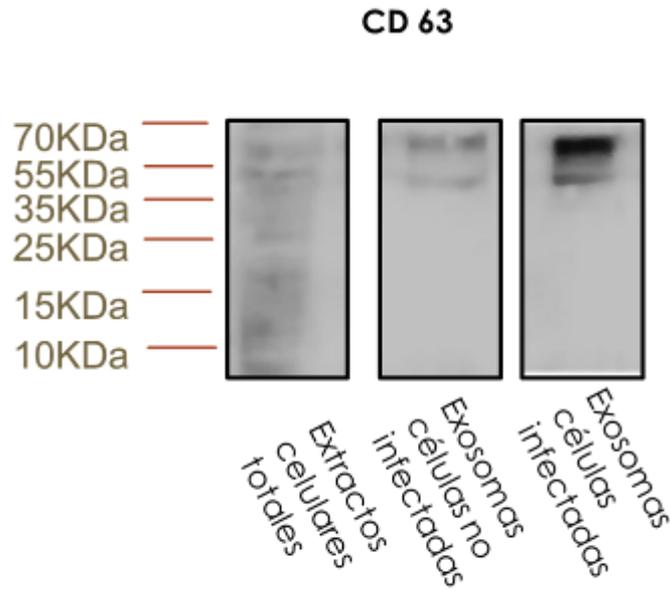
## 9.2.-Identificación de marcadores exosomales.

Para la identificación exosomal se determinó la presencia de las tetraspaninas CD81 y CD63 mediante ensayos de western blot. Se realizó el análisis de la tetraspanina CD81 en condiciones de pre y post enriquecimiento con las perlas magnéticas, concordando con lo esperado y observado en la microscopia electrónica se presenta un enriquecimiento de la proteína CD81 posterior al tratamiento.



**Figura 14. Identificación de la proteína CD81 en la fracción exosomal.** Las proteínas obtenidas de los exosomas antes de la inmunoprecipitación (pre enriquecimiento) y después de la inmunoprecipitación (post IP) fueron sometidas a PAGE-SDS y Western blot usando anticuerpos anti CD-81(dil 1:2500). La migración del marcador de 25 kDa se indica del lado izquierda.

Del mismo modo se evaluó a la tetraspanina CD63 obteniendo un resultado positivo tanto en exosomas de células no infectadas como en exosomas de células infectadas (Figura 15)

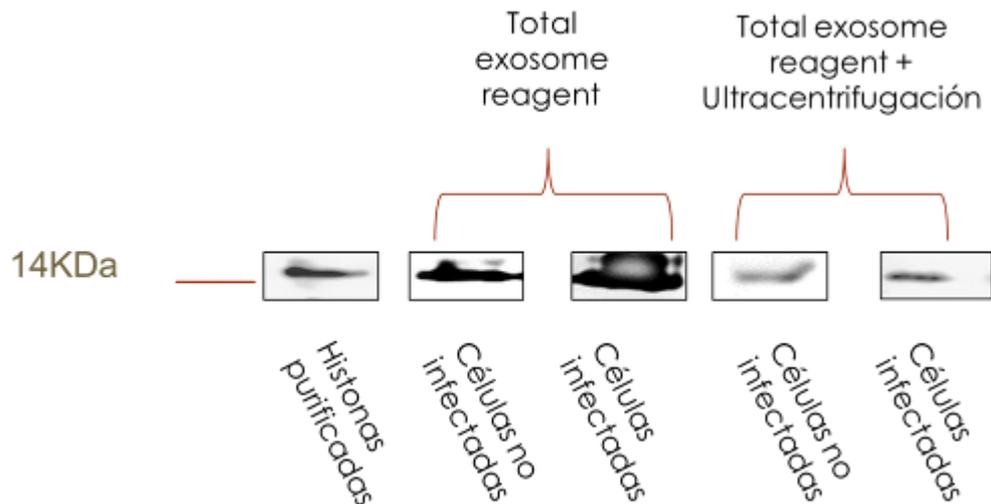


**Figura 15. Identificación de la proteína CD63 en la fracción exosomal.** Las proteínas obtenidas de los extractos celulares totales y de exosomas de células infectadas y no infectadas fueron sometidas a PAGE-SDS y a Western blot usando anticuerpos anti CD-63 (1:500). La migración del marcador de peso molecular se indica del lado izquierda.

Las pruebas anteriores nos permitieron validar los resultados de microscopía electrónica e inmunomarcajes, las vesículas aisladas cuentan con los criterios para ser consideradas exosomas esto gracias a su tamaño, forma, proteínas residentes y marcadores de superficie CD63 y CD81.

### 9.3.-Identificación de la histona H2B en exosomas.

Además de cerciorarnos de la presencia de los marcadores proteicos clásicos, fue conveniente identificar proteínas que son arrastradas en los exosomas. Para ello, se eligió a la histona H2B, una proteína que interacciona directamente con el material genético debido a su naturaleza básica. (Figura 16)

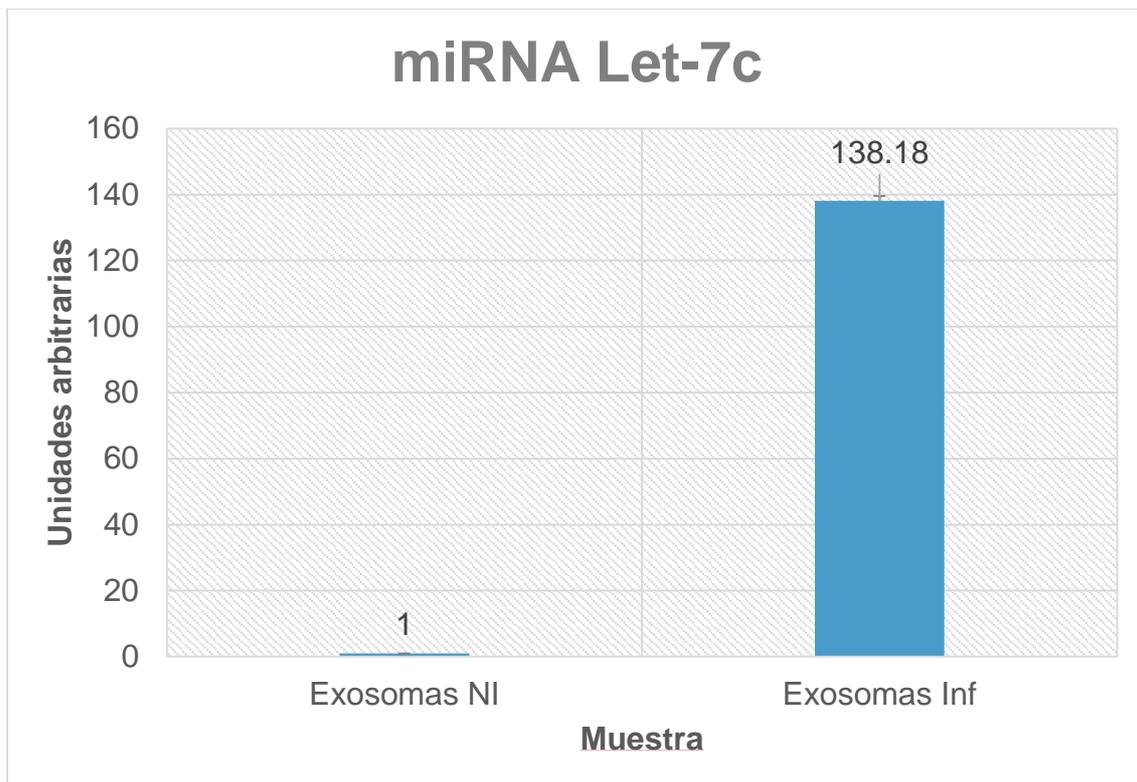


**Figura 16. Detección de la histona H2B en exosomas obtenidos bajo diversas condiciones.** La presencia de la Histona H2B en la fracción de exosomas precipitados (tanto con la adición del reactivo “Total exosome isolation reagent” así como la metodología que combina la centrifugación diferencial con la adición del reactivo) de células no infectadas como aquellos que provienen de células infectadas se logró mediante ensayos de western blot utilizando un anticuerpo específico. En el primer carril se muestran histonas purificadas como control positivo, en los carriles 2 y 3 se muestran exosomas extraídos con el reactivo Total exosome, en los carriles 4 y 5 muestran exosomas extraídos con el protocolo de centrifugación diferencial y el reactivo total exosome.

## 10.-Identificación de material genético contenido en exosomas.

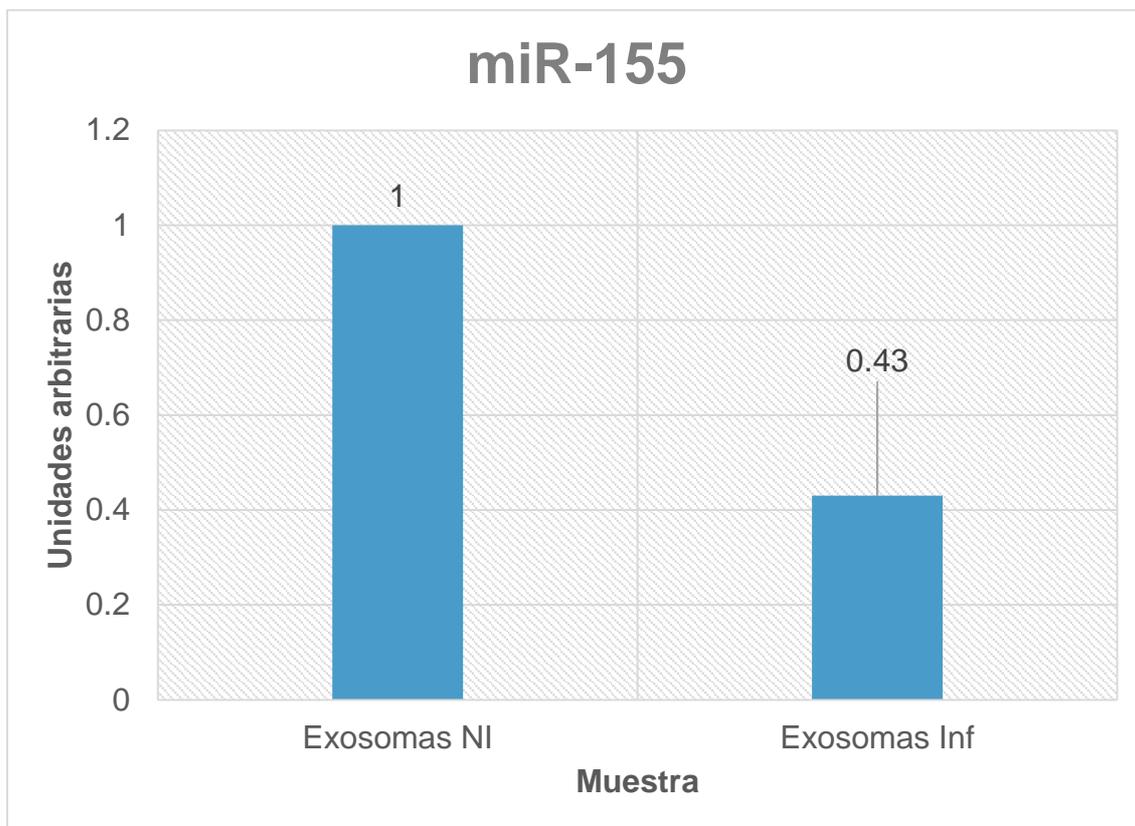
Como se mencionó en la introducción los exosomas también son vehículos de material genético especialmente RNA y más específicamente de miRNAs. Los miRNA let-7c y mir155 se ha descrito que aumentan y se reducen respectivamente en las células infectadas con el DENV. Por esta razón decidimos determinar su presencia en los exosomas provenientes tanto de células no infectadas como infectadas con DENV, y en las vesículas, lo que nos hablaría de cómo es la comunicación entre la célula parental y la receptora. En el caso del miRNA Let-7c se observó un aumento significativo de hasta 138.18

veces en los exosomas de células infectadas con respecto a los provenientes de células control (Figura 17). Este ensayo se aplicó debido a previos reportes en los cuales se mencionan la sobre expresión de Let-7c y su papel antiviral en contra de la infección por dengue, esto en células completas sin embargo observamos que este comportamiento se conserva aún en las vesículas conocidas como exosomas .



**Figura 17. El miRNA Let-7c se encuentra en mayor concentración en más en exosomas de células infectadas con DENV.** Los exosomas de células no infectadas (NI) e infectadas fueron aislados y la población de miRNA fue purificada. La qRT-PCR del miRNA Let-7c se realizó mediante el uso de oligonucleótidos específicos, La cantidad de de los miRNA se presenta en unidades arbitrarias.

Por otro lado, se realizó la cuantificación del miR-155 presentes en los exosomas obtenidos de las células no infectadas e infectadas con el DENV. En este caso, se observó una disminución del 67% en los exosomas de células infectadas, con respecto a las células no infectadas (Figura 18).



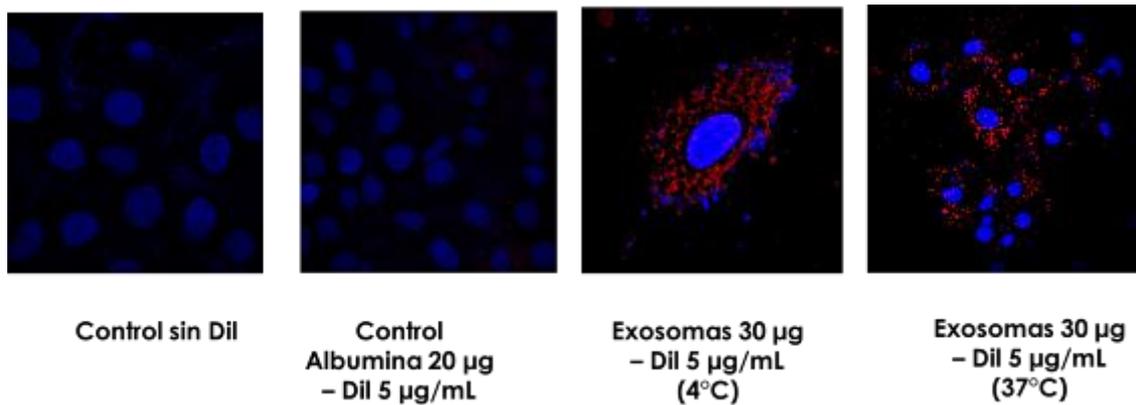
**Figura 18. El miRNA 155 se encuentra en menor cantidad en los exosomas de células infectadas con DENV.** Los exosomas de células no infectadas (NI) e infectadas (inf) fueron aislados y la población de miRNA fue purificada. La qRT-PCR del miRNA 155 se realizó mediante el uso de oligonucleótidos específicos, La presencia del miRNA 155 se redujo en un 67% en los exosomas de células infectadas con respecto al de las no infectadas. La cantidad de miRNA en el control se le asignó el valor de 1.

### **11.-Captacion de exosomas por células Huh7.**

Con el fin de evaluar si los exosomas aislados eran capaces de ser captados por una célula receptora se realizó un ensayo de captación de exosomas provenientes de células U937-DC-SIGN. Las células Huh-7, derivadas de hepatocarcinoma, se expusieron a exosomas teñidos con el colorante Dil. Los exosomas se pusieron en contacto con las células a 4°C por 30 minutos, o a 37°C posterior a la incubación de 4°C por el mismo periodo de tiempo Con estas

temperaturas se evaluó el proceso tanto de acoplamiento a la célula, como la internalización. (Figura 19).

Las células incubadas solo a 4°C muestran una marca de Dil distribuida sobre la membrana mientras que aquellas que fueron tratadas a 37°C muestran una distribución de la marca en el citoplasma celular, sugiriendo la internalización de los exosomas.



**Figura 19. Ensayo de captación de exosomas.** Las células Huh-7 se incubaron en ausencia (control sin DIL), o en presencia de albúmina incubada con Dil o de exosomas marcados con Dil a 4 o a 37°C por 30 min. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las muestras fueron visualizadas por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de cada condición

## **12.-Discusión de resultados.**

El dengue, es la enfermedad viral transmitida por vector más importante del mundo, su amplia distribución, así como los patrones de movilidad en el mundo han hecho que esta infección sea una prioridad para los servicios de salud pública, sobre todo debido al impacto en el desarrollo económico del país afectado. La falta de un tratamiento farmacológico específico, así como un esquema de vacunación adecuado dificultan el manejo y control de la infección. Por todo lo anterior, entender los mecanismos patológicos de la enfermedad se ha convertido en una de las líneas de investigación más prolíficas. Muchos factores están involucrados en el desarrollo de la enfermedad, entre ellos están los que pertenecen a la respuesta del huésped ante la infección o aquellos elementos virales que activan a las células. Los mediadores de la respuesta inmune como las citocinas juegan un papel determinante en el intercambio de información, sin embargo, poco se ha investigado sobre la comunicación mediada por cuerpos vesiculares durante la infección por DENV. [22]

La caracterización de las vesículas extracelulares conocidas como exosomas se ha convertido en una prioridad para encontrar una nueva aproximación a procesos patológicos en enfermedades ya conocidas como el cáncer [32]. Los protocolos clásicos para el aislamiento de exosomas incluyen la ultracentrifugación y gradientes de sacarosa. Para este estudio, se modificó el protocolo clásico [33] [34] agregando el reactivo higroscópico "Total exosome isolation". La centrifugación diferencial nos ayudó a eliminar los componentes celulares contaminantes como los detritos celulares, cuerpos apoptóticos y micro vesículas para después purificar el contenido exosomal por la adición del reactivo que ayuda a precipitar los componentes menos solubles, en este caso el material vesicular. Una vez enriquecido el material exosomal con las centrifugaciones y la precipitación con el reactivo, se determinó la presencia de una proteína contenida en los exosomas como medio de discriminación de una población específica de los mismos, mediante la inmunoprecipitación con perlas magnéticas como lo mostrado en este estudio. Para la selección de los exosomas, se han usado enzimas como la acetilcolinesterasa, sin embargo, al

utilizar la tetraspanina CD81 un marcador clásico de exosomas, se puede seleccionar y obtener una población amplia de estas vesículas [35] [36].

Una vez que los exosomas han sido enriquecidos o precipitados, el análisis morfológico y su tamaño, se ha convertido en una herramienta útil y accesible para identificar estas vesículas [37] [38] [39]. En microscopías electrónicas los exosomas se observan como entidades de entre 30 a 100 nm [40] de diámetro con una doble membrana delimitando un cuerpo esférico o con forma de copa, aunque describirlos como pleomorfos sería una aproximación más apegada a los reportes previos. En este estudio se logró observar una entidad cercana a los 90 nm delimitada por una membrana y con morfología esférica, que corresponde con la descripción típica de los exosomas, lo que nos permitió sugerir que el proceso de centrifugaciones estaba funcionando para el aislamiento de exosomas. Por otro lado, las vesículas provenientes de la inmunoprecipitación también se observaron por microscopía electrónica, confirmando la presencia de cuerpos delimitados con una membrana lipídica, que, aunque con un tamaño menor a las observadas anteriormente (88.12 nm) comparten un tamaño y morfología similar entre ellas, por lo que se puede sugerir fuertemente que se seleccionó una población específica de exosomas. La detección de la tetraspanina mediante marcaje con oro coloidal, así como la presencia de una doble membrana en estas partículas inmunoprecipitadas confirma que las vesículas son exosomas. Asimismo, la ausencia de la proteína GRP78 en las vesículas exosomales, confirmó que estas preparaciones no contenían entidades contaminantes, que podrían haber sido arrastradas durante el protocolo de centrifugación modificado.

Una vez que se confirmaron las características básicas de los exosomas y que se obtuvo un purificado de los mismos, se decidió determinar la presencia de marcadores proteicos de exosomas. De manera general, las moléculas involucradas en la biogénesis exosomal como las proteínas del complejo ESCRT [41] o las proteínas transmembranales CD9 CD81 y CD63 se han usado para validar la purificación de exosomas, esto porque dichas moléculas se encuentran enriquecidas en los cuerpos intraluminales dentro de los cuerpos multivesiculares.

Nuestra validación involucró a las proteínas CD63 y CD81. La tetraspanina CD 63 se encuentra tanto en extractos totales de las células U937 DC-SIGN como en los exosomas aislados por lo que se confirma que las vesículas observadas efectivamente son exosomas. En el caso de la proteína CD81 se observó el mismo comportamiento que en las microscopias electrónicas, el tratamiento con las perlas magnéticas permite enriquecer la población vesicular. El resultado de la validación morfológica e inmunológica se considera exitosa ya que los parámetros físicos coinciden con lo reportado y además se identificaron los marcadores de superficie en los exosomas.

Como se mencionó previamente, los exosomas tienen funciones que poco a poco se van conociendo en las infecciones virales [42], estos papeles dependen del contenido exosomal ya sea de proteínas o de ácidos nucleicos; por esa razón, se decidió estudiar a la histona H2B ya que esta proteína se encuentra normalmente en el núcleo de las células, formando parte de los complejos que interactúan directamente con el ADN y que son conocidos como nucleosomas. Previamente se había reportado que esta molécula es capaz de ser transportada en exosomas [43], hecho que se confirmó durante la realización de este trabajo tanto en células no infectadas como en las infectadas con DENV. Las histonas al tener una naturaleza básica son capaces de interactuar con el material genético de características ácidas. Las histonas al ir contenidas dentro de los exosomas podrían tener un papel de estabilización de la carga, mientras que al ir en el exterior de los exosomas las histonas pueden interactuar con los proteoglicanos extracelulares [44]. Esta última posibilidad está apoyada por el hecho de que los exosomas requieren para su internalización, de la interacción con un receptor celular, papel que cumplirían las histonas al encontrarse con los proteoglicanos en la superficie de la célula receptora. Asimismo, se podría suponer debido a la mecánica de su internalización [31], que los exosomas requieren de interactuar con un correceptor como el proteoglicano previo a su acople a pozos preformados de clatrina.

Siguiendo con la identificación del contenido exosomal, se procedió a analizar los perfiles de expresión de dos miRNAs que previamente se habían postulado

como elementos de respuesta a la infección por flavivirus: Let-7c y miR-155. Los miRNAs se encuentran enriquecidos dentro de los exosomas [45] por lo que su cuantificación nos da una idea del mensaje que las células tratan de comunicarse entre ellas. En el primer caso el miRNA Let-7c pertenece a una familia de miRNAs involucrados en una variedad de procesos como son la morfogénesis del individuo y en el stress oxidativo, así como en la respuesta a infecciones virales como el virus de la Hepatitis C, Influenza e incluso el virus dengue [46], [47], [48]. Let-7c se encuentra 137 veces más concentrado en exosomas de células infectadas con DENV, respecto a las no infectadas, por lo que se espera que la célula que recibe el mensaje sería capaz de activar una respuesta antiviral mediada por la regulación en la transcripción de genes de estrés oxidativo como son BACH-1 y HO-1. Estas proteínas al ser reguladas positivamente son capaces de contrarrestar el estrés producido durante la infección viral y regularían negativamente la replicación del virus. Por otro lado, el miR-155 tiene como blanco proteínas de respuesta a interferón y se ha reportado que participa activamente en la respuesta celular contra la infección del virus de la encefalitis japonesa (JEV por sus siglas en inglés) con un mecanismo que involucra la regulación de proteínas que el virus ocupa durante su ciclo de replicación. De este modo, es capaz de afectar de manera negativa el ciclo de vida del virus sin depender directamente de la señalización del interferón [49] [50]. En este estudio se observó una disminución del 67% con respecto a las células control. Este comportamiento ya se había reportado previamente, aunque a tiempos tan tempranos de la infección como son 6 horas, con el posterior restablecimiento de la expresión del miRNA a las 24 horas, (REF). Cabe destacar que lo reportado se basa en células totales y no en exosomas por lo que el restablecimiento de la expresión puede ser más tardado en los exosomas.

Con la información anterior podríamos proponer un modelo en el cual las células U937-DC-SIGN comunican a las células circundantes un mensaje que promueve la limitación de la infección mediada por Let-7c mientras que el virus modula de manera negativa otro flanco de la respuesta celular al reducir el empaquetamiento de miR-155.

Finalmente, para evaluar si los exosomas aislados de las células U937-DC-SIGN eran capaces de ser internalizados por otras células se usó a la línea celular

Huh7 de origen hepático. Se eligió este modelo ya que es blanco de infección del DENV y por la comunicación natural que ocurre entre estas dos células en el contexto de la infección. Se observó que las células hepáticas son capaces de unir a los exosomas en su superficie y posteriormente internalizarlos. Este ensayo nos permitió evaluar que la comunicación entre las dos líneas celulares es posible, sin embargo, aún no sabemos si esto ocurre in vivo, cuál es el resultado de esta comunicación, y si ocurre para inhibir o promover la infección de las células receptoras.

### **13.-Conclusiones:**

- Se aislaron exosomas procedentes de las células U937-DC-SIGN tanto de células no infectadas como infectadas con el DENV.
- Se identificaron los marcadores clásicos CD81 y CD 63 así como a la histona H2B en los exosomas.
- Se detectó un incremento de 137 veces en el miRNA Let-7c en los exosomas provenientes de las células infectadas con DENV respecto a las no infectadas.
- Se detectó una disminución de 0.67 veces en el miRNA mir155 en los exosomas de células infectadas con DENV respecto a las no infectadas.

### **14.-Perspectivas:**

- Identificar los RNA contenidos en los exosomas, así como sus niveles de expresión con la ayuda de un microarreglo.
- Identificar las proteínas contenidas en los exosomas con la ayuda de espectrometría de masas y elegir proteínas candidato para un estudio más profundo.

## 15.-Bibliografía:

- [1] Bäck, Anne T, and Åke L. "Dengue Viruses--an Overview." *Infection ecology & epidemiology* 3 (2013).
- [2] Carrington, Lauren B, and Cameron P Simmons. "Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses." *Frontiers in immunology* 5 (2014): doi:10.3389.
- [3] Organization, World Health, Special Programme for Research, Training in Tropical Diseases, World Health Organization Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization Epidemic, and Pandemic Alert. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. World Health Organization, 2009.
- [4] Global Alert and Response (GAR) Impact of Dengue <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/> [Revisado el 30 de agosto del 2015]
- [5] Panorama Epidemiológico de fiebre por Dengue y fiebre hemorrágica por Dengue. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMA\\_2014/panodengue\\_sem\\_34\\_2014.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMA_2014/panodengue_sem_34_2014.pdf) [Revisado el 2 de septiembre del 2015]
- [6] Kuhn, Richard J, Wei Zhang, Michael G Rossmann, Sergei V Pletnev, Jeroen Corver, Edith Lenches, Christopher T Jones, Suchetana Mukhopadhyay, Paul R Chipman, and Ellen G Strauss. "Structure of Dengue Virus Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion." *Cell* 108, no. 5 (2002): doi:10.1016/S0092-8674(02)00660-8.
- [7] Alcaraz-Estrada, Martha Yocupicio-Monroy, and Rosa María del Angel. "Insights Into Dengue Virus Genome Replication." *Future Virology* 5, no. 5 (2010): 575-592.
- [8] Smit, Jolanda M, Bastiaan Moesker, Izabela Rodenhuis-Zybert, and Jan Wilschut. "Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion." *Viruses* 3, no. 2 (2011): doi:10.3390/v3020160.

- [9] Richter, Mareike K S, Júlia M da Silva Voorham, Silvia Torres Pedraza, Tabitha E Hoornweg, Denise P I van de Pol, Izabela A Rodenhuis-Zybert, Jan Wilschut, and Jolanda M Smit. "Immature Dengue Virus Is Infectious in Human Immature Dendritic Cells Via Interaction with the Receptor Molecule DC-SIGN." *PloS one* 9, no. 6 (2014): doi:10.1371/journal.pone.0098785.
- [10] St. John, A. L., Abraham, S. N., & Gubler, D. J. (2013). Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nat Rev Micro*, 11(6), 420–426. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3030>
- [11] Thomas M, Ashhurst, Caryn van Vreden, Luis Munoz-Erazo, Paula Niewold, Kanami Watabe, Rachael L. Terry, Celine Deffrasnes, Daniel R. Getts, Nicholas Jonathan Cole King. Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *Indian J Med Res.* 138(5): 632-647
- [12] Mathivanan, Suresh, Hong Ji, and Richard J Simpson. "Exosomes: Extracellular Organelles Important in Intercellular Communication." *Journal of proteomics* 73, no. 10 (2010): doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- [13] Kowal, Joanna, Mercedes Tkach, and Clotilde Théry. "Biogenesis and Secretion of Exosomes." *Current Opinion in Cell Biology* 29C (2014): doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.
- [14] Raposo, Graça, and Willem Stoorvogel. "Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends." *The Journal of cell biology* 200, no. 4 (2013): doi:10.1083/jcb.201211138.
- [15] Wubbolts, Richard, Rachel S Leckie, Peter T M Veenhuizen, Guenter Schwarzmann, Wiebke Möbius, Joerg Hoernschemeyer, Jan-Willem Slot, Hans J Geuze, and Willem Stoorvogel. "Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes. Potential Implications for Their Function and Multivesicular Body Formation." *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 13 (2003): doi:10.1074/jbc.M207550200.
- [16] Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <http://doi.org/10.1038/ncb1596>

- [17] Cheng, L., Sharples, R. a, Scicluna, B. J., & Hill, A. F. (2014). Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 1–14. <http://doi.org/10.3402/jev.v3.23743>
- [18] Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., ... Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766–9. <http://doi.org/10.1038/cr.2014.44>
- [19] Kahlert, C., Melo, S. a., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., ... Kalluri, R. (2014). Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 3869–3875. <http://doi.org/10.1074/jbc.C113.532267>
- [20] Delorme-Axford, Elizabeth, Rogier B Donker, Jean-Francois Mouillet, Tianjiao Chu, Avraham Bayer, Yingshi Ouyang, Tianyi Wang, and others. "Human Placental Trophoblasts Confer Viral Resistance to Recipient Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, no. 29 (2013): doi:10.1073/pnas.1304718110.
- [21] Ramakrishnaiah, Vedashree, Christine Thumann, Isabel Fofana, Francois Habersetzer, Qiuwei Pan, Petra E de Ruyter, Rob Willemsen, and others. "Exosome-mediated Transmission of Hepatitis C Virus Between Human Hepatoma Huh7.5 Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, no. 32 (2013): doi:10.1073/pnas.1221899110
- [22] Zhu, X., He, Z., Yuan, J., Wen, W., Huang, X., Hu, Y., ... Li, M. (2015). IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cellular Microbiology*, 17(1), 105–118. <http://doi.org/10.1111/cmi.12339>
- [23] Khatua, Atanu K, Harry E Taylor, James E K Hildreth, and Waldemar Popik. "Exosomes Packaging APOBEC3G Confer Human Immunodeficiency Virus Resistance to Recipient Cells." *Journal of virology* 83, no. 2 (2009): doi:10.1128/JVI.01658-08.

- [24] Duelli, Dominik M, Stephen Hearn, Michael P Myers, and Yuri Lazebnik. "A Primate Virus Generates Transformed Human Cells by Fusion." *The Journal of cell biology* 171, no. 3 (2005): doi:10.1083/jcb.200507069.
- [25] Passmore, J S, P T Lukey, and S R Ress. "The Human Macrophage Cell Line U937 As An in Vitro Model for Selective Evaluation of Mycobacterial Antigen-specific Cytotoxic T-cell Function." *Immunology* 102, no. 2 (2001): 146-156.
- [26] Jansen, Flip H, Jeroen Krijgsveld, Angelique van Rijswijk, Gert-Jan van den Bemd, Mirella S van den Berg, Wytse M van Weerden, Rob Willemsen, Lennard J Dekker, Theo M Luider, and Guido Jenster. "Exosomal Secretion of Cytoplasmic Prostate Cancer Xenograft-derived Proteins." *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, no. 6 (2009): doi:10.1074/mcp.M800443-MCP200.
- [27] Lässer, C., Eldh, M., & Lötvall, J. (2012). Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *Journal of Visualized Experiments*, (59), 1–6. <http://doi.org/10.3791/3037>
- [28] Hood, J. L., San, R. S., Wickline, S. a, & Roman, S. S. (2011). Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Research*, 71(11), 3792–3801. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4455>
- [29] Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R., & Yoshiyama, H. (2013). Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *Journal of Virology*, 87(18), 10334–47. <http://doi.org/10.1128/JVI.01310-13>
- [30] Nanbo, A., Imai, M., Watanabe, S., Noda, T., Takahashi, K., Neumann, G., ... Kawaoka, Y. (2010). Ebola virus Is Internalized into Host Cells via Macropinocytosis in a Viral Glycoprotein-Dependent Manner. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001121. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001121>
- [31] Tian, T., Zhu, Y. L., Hu, F. H., Wang, Y. Y., Huang, N. P., & Xiao, Z. D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of Cellular Physiology*, 228(November), 1487–1495. <http://doi.org/10.1002/jcp.24304>
- [32] Kruger, S., Abd Elmageed, Z. Y., Hawke, D. H., Wörner, P. M., Jansen, D. a, Abdel-Mageed, A. B., ... Izadpanah, R. (2014). Molecular characterization of

exosome-like vesicles from breast cancer cells. *BMC Cancer*, 14, 44. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-44>

[33] Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., ... Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(0). <http://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>

[34] Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S. F., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1(27031), 1–11.

[35] Cantin, R., Diou, J., Bélanger, D., Tremblay, A. M., & Gilbert, C. (2008). Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *Journal of Immunological Methods*, 338(1-2), 21–30. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2008.07.007>

[36] Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. (2015) A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol* 1295:179-209

[37] Fernández-Llama, P., Khositseth, S., Gonzales, P. a, Star, R. a, Pisitkun, T., & Knepper, M. a. (2010). Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney International*, 77(8), 736–742. <http://doi.org/10.1038/ki.2009.550>

[38] Gennebäck N, Hellman U, Malm L, et al. Growth factor stimulation of cardiomyocytes induces changes in the transcriptional contents of secreted exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013; 2:10.3402/jev. v2i0.20167. doi:10.3402/jev. v2i0.20167.

[39] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *Afarinkia K, ed. PLoS ONE*. 2012;7(3): e30679. doi: 10.1371/journal.pone.0030679.

[40] Mehdiani, A., Maier, A., Pinto, A., Barth, M., Akhyari, P., & Lichtenberg, A. (2015). An Innovative Method for Exosome Quantification and Size Measurement. *Journal of Visualized Experiments*, (95), 1–9. <http://doi.org/10.3791/50974>

- [41] Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., ... Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 24), 5553–65. <http://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- [42] Meckes, D. G., & Raab-Traub, N. (2011). Microvesicles and Viral Infection. *Journal of Virology*, 85(24), 12844–12854. <http://doi.org/10.1128/JVI.05853-11>
- [43] Nangami, G., Koumangoye, R., Shawn Goodwin, J., Sakwe, A. M., Marshall, D., Higginbotham, J., & Ochieng, J. (2014). Fetuin-A associates with histones intracellularly and shuttles them to exosomes to promote focal adhesion assembly resulting in rapid adhesion and spreading in breast carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 328(2), 388–400. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.037>
- [44] Watson, K., Gooderham, N. J., Davies, D. S., & Edwards, R. J. (1999). Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21707–21713. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21707>
- [45] Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1), 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
- [46] Escalera-Cueto, M., Medina-Martínez, I., del Angel, R. M., Berumen-Campos, J., Gutiérrez-Escolano, A. L., & Yocupicio-Monroy, M. (2015). Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. *Virus Research*, 196, 105–112. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.010>
- [47] Ma, Y.-J., Yang, J., Fan, X.-L., Zhao, H.-B., Hu, W., Li, Z.-P., ... Wang, S.-Q. (2012). Cellular microRNA let-7c inhibits M1 protein expression of the H1N1 influenza A virus in infected human lung epithelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(10), 2539–2546. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01572.x>
- [48] Cheng, J.-C., Yeh, Y.-J., Tseng, C.-P., Hsu, S.-D., Chang, Y.-L., Sakamoto, N., & Huang, H.-D. (2012). Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus

replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(15), 2621–2633.  
<http://doi.org/10.1007/s00018-012-0940-6>

[49]Thounaojam, M. C., Kundu, K., Kaushik, D. K., Swaroop, S., Mahadevan, a., Shankar, S. K., & Basu, a. (2014). MicroRNA 155 Regulates Japanese Encephalitis Virus-Induced Inflammatory Response by Targeting Src Homology 2-Containing Inositol Phosphatase 1. *Journal of Virology*, 88(9), 4798–4810.  
<http://doi.org/10.1128/JVI.02979-13>

[50]Pareek, S., Roy, S., Kumari, B., Jain, P., Banerjee, A., & Vrati, S. (2014). miR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 97. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-11-97>

[51]Pegtel, D. M., van de Garde, M. D. B., & Middeldorp, J. M. (2011). Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(11-12), 715–721.  
<http://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.08.002>