



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACANTENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGENÉISIS MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE PROTEÍNAS VIRALES EN LOS EXOSOMAS
SECRETADOS POR LAS CÉLULAS C6/36 INFECTADAS CON DENV-2**

Tesis
Que presenta

Biol. Carla Elizabeth Gallardo Flores

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INFECTÓMICA Y PATOGENÉISIS MOLECULAR**

Directora de tesis: Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 8 DE VIROLOGÍA BAJO LA TUTORÍA DE LA DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL, PROFESORA E INVESTIGADORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATÓGENESIS MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

Directora de tesis

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

Asesores

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dr. Juan Santiago Salas Benito

AGRADECIMIENTOS

En primero lugar, me gustaría agradecer a mi papás, Catalina Flores y Juan Manuel Gallardo, quienes siempre me han apoyado en todas mis decisiones y logros. Les agradezco mucho también por haberme brindado las herramientas necesarias para conseguirlos.

Quiero agradecer a la familia Flores-Maldonado cuyo apoyo incondicional ha permitido mi formación. Particularmente a Papá Nane y Mamá Nane. De igual forma a algunos miembros de la familia Gallardo-Montoya.

Agradezco también a mi tutora la Dra. Rosa Ma. Del Ángel y a mis compañeros Fernando Ruiz y Manuel Reyes por su paciencia y enseñanza. Así como por sus consejos.

Finalmente, también agradezco a mis amigos, particularmente a Yaz, Dany y Flores, quienes han estado conmigo desde siempre en las buenas y en las malas. De igual manera, agradezco a mis compañeros del lab y de la maestría.

La realización de este proyecto fue posible gracias al Conacyt por la beca otorgada número CVU 927678.

ÍNDICE

Lista de abreiaturas	5
Lista de Figuras	5
Resumen.....	6
Antecedentes.....	7
Justificación.....	27
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	28
Métodos.....	29
Resultados.....	35
Discusión.....	43
Conclusión.....	46
Referencias.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

DENV	Virus Dengue
DHF	Fiebre Hemorrágica del Dengue
DF	Fiebre del Dengue
NS	No estructural
DC	Células Dendríticas
EV	Vesículas Extracelulares
MVB	Cuerpo Multivesicular
ILV	Vesícula Intraluminal
EBV	Epstein Barr Virus
HTLV	Virus Linfotrófico T Humano
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ZIKV	Virus Zika
LGTV	Virus Langat
TEM	Microdominios enriquecidos con tetraspaninas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tipos de Vesículas Extracelulares
- Figura 2** Biogénesis de Exosomas
- Figura 3** Entrega del cargo a la célula blanco
- Figura 4** Detección de tetraspaninas CD9 y CD63 en exosomas derivados de células infectadas C6/36.
- Figura 5** Detección de Calnexina en las preparaciones de exosomas
- Figura 6** Exosomas analizados por microscopía electrónica de transmisión
- Figura 7** Detección de proteína E en extracto de células infectadas DENV-2
- Figura 8** Detección de proteína E en exosomas infectadas con DENV-2.
- Figura 9** Detección de proteína viral E en exosomas CD9+ derivados de células C6/36 infectadas con DENV-2
- Figura 10** Detección de proteína viral E en exosomas CD9+ de C6/36 infectadas con DENV-2.

1. RESUMEN

Los exosomas son vesículas membranosas pequeñas (30-150nm) de origen endocítico que son secretadas al medio extracelular por muchos tipos celulares. Estas vesículas conforman un tipo de comunicación celular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Particularmente, se ha reportado que los exosomas participan durante las infecciones virales y son capaces de promover o regular la transmisión viral. El Dengue es la enfermedad viral más importante del mundo transmitida por mosquitos y hasta ahora no existe una vacuna que ofrezca protección a largo plazo contra los cuatro serotipos de DENV. Estudios previos tanto en células de mamífero como de mosquito indican que los exosomas participan durante la infección por DENV. En este trabajo se estandarizaron las metodologías para el aislamiento de exosomas provenientes de células de mosquito C6/36 infectadas por DENV-2 y se analizó su capacidad de infectar a células de mamífero, mediante el estudio del contenido viral en estas vesículas. Se encontró que los exosomas derivados de células de mosquito C6/36 contienen proteínas virales como la proteína de envoltura viral E así como la proteína no estructural NS3.

2. ANTECEDENTES

2.1 DENGUE

2.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL DENGUE

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante del mundo (Diamond & Pierson, 2015). Esta enfermedad es causada por el virus Dengue (DENV), perteneciente a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*. Existen cuatro serotipos distintos de DENV (1, 2, 3 y 4) que circulan principalmente en zonas tropicales y subtropicales y que son transmitidos por mosquitos del género *Aedes* (*Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*) (Colón-González et al., 2013; Diamond & Pierson, 2015). Estos serotipos difieren entre sí en un 25 a 40% a nivel de aminoácidos y hasta un 3% a nivel genómico (Diamond & Pierson, 2015) y los cuatro son de importancia médica.

En las últimas décadas, se ha observado que la incidencia de DENV ha aumentado a causa de la expansión de la actividad humana (e.g comercio y viaje global y urbanización), la expansión del nicho ecológico de los vectores asociada al cambio climático, así como la carencia de un método efectivo para el control de los mismos (Diamond & Pierson, 2015). Anualmente, DENV infecta más de 100 países con aproximadamente 3.6 billones de personas en riesgo (WHO, 2017), causando epidemias en América, África, Asia y Australia con un impacto económico de aproximadamente 1 billón de dólares.

2.1.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La enfermedad del DENV presenta distintas manifestaciones clínicas; el Dengue asintomático, la Fiebre del Dengue Clásico (DF), Dengue Severo (SD), antes conocido como Fiebre Hemorrágica del Dengue (DHF), y el Síndrome de shock por Dengue (DSS). En la mayoría de los casos, la enfermedad por DENV es asintomática, principalmente en pacientes jóvenes sin un historial previo de dengue. Por otro lado, la DF se caracteriza por presentar fiebre abrupta con dolor de cabeza, dolor muscular y articular, así como erupción cutánea que dura de 7 a 14 días (CDC, 2019). Si la DF continúa o si se trata de una infección secundaria heteróloga, es decir una infección con un serotipo de DENV distinto a la infección primaria, esta puede evolucionar al SD, la cual es una complicación de la DF y se caracteriza por presentar cambios bruscos en la temperatura corporal (desde fiebre hasta hipotermia), rápida dilatación capilar, hemorragia en piel y tracto gastrointestinal, así como trombocitopenia y daño al hígado. Finalmente, el DSS se define como un caso grave caracterizado por presentar todos los síntomas del SD así como presentar otras complicaciones como la falla circulatoria y hemoconcentración e hipotensión a causa de la pérdida de fluidos que pueden resultar en casos fatales (Halstead et al., 2007).

Interesantemente, se ha reportado que, aunque la primera infección con alguno de los cuatro serotipos provee protección a largo plazo contra una re-infección homóloga, una infección secundaria con un serotipo heterólogo es

un factor de riesgo importante para presentar la forma severa de la enfermedad ocasionada por el DENV (Dejnirattisai et al., 2010; Guzman, Alvarez, & Halstead, 2013; Sierra et al., 2010).

2.1.3 BIOLOGÍA DEL VIRUS DENGUE

Como todos los virus pertenecientes al género *Flavivirus*, el genoma de DENV presenta una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva. Este RNA es infectivo pues es traducido directamente por los ribosomas celulares sin la necesidad de un intermediario. El producto de esta traducción es una poliproteína cuyo corte en sitios específicos genera 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (NS) necesarias para completar el ciclo de replicación.

Las tres proteínas estructurales son: la proteína de membrana (M), la glicoproteína de envoltura (E) y la proteína de la cápside (C). Los virus intracelulares presentan el péptido PrM a partir de la cual se genera la proteína M, presente en virus maduros extracelulares. Tanto M como C son proteínas internas, mientras que E se encuentra en la superficie del virión y es la proteína blanco de anticuerpos neutralizantes (Zhao et al., 1987). Por otro lado, las proteínas NS son la NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Estas proteínas son necesarias para completar el ciclo de replicación viral.

El ciclo de replicación del DENV comienza con la entrada del virus a las células. Este paso es mediado por el reconocimiento y la unión de la proteína viral E con el receptor celular. Se ha descrito que DENV puede ser reconocido por numerosos receptores celulares tanto en células de mosquitos como de humanos (Hidari & Suzuki, 2011).

En mosquitos, DENV puede entrar a la célula por medio de la interacción de la proteína E con numerosos receptores celulares tales como la proteína de unión a laminina así como proteínas relacionadas a la proteína de choque térmico 90 (Hsp 90). Interesantemente, estas proteínas se encuentran tanto en líneas celulares de mosquitos permisivas a la infección por DENV, como en la glándula salival, el intestino medio y el ovario (Hidari & Suzuki, 2011), mismos órganos donde DENV completa parte de su ciclo replicativo en los vectores invertebrados.

En humanos, también existen numerosas moléculas que funcionan como receptores para la entrada del virus, tales como: lectinas (DC-SIGN, DC-SIGNR y Manosa R.), heparán sulfato, moléculas de la familia TIM/TAM, entre otros (Hidari & Suzuki, 2011). En mamíferos, DENV es capaz de infectar células dendríticas (DCs), monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, así como hepatocitos, células Kupffer, neuronas o células de la microglía y células endoteliales (Reyes-del Valle et al., 2014).

Una vez reconocido el receptor celular, el virus es endocitado al interior de la célula por medio de la vía de las clatras. Posterior a la endocitosis, el cambio en el pH ocasiona la disociación de los homodímeros de la proteína E, lo cual expone dominios hidrofóbicos y permite la fusión de la membrana del virus con la membrana del endosoma. Finalmente, el RNA viral es liberado al interior de la célula.

El RNA monocatenario de polaridad positiva es traducido por los ribosomas celulares presentes en el retículo endoplásmico rugoso en una poliproteína que es procesada para producir las tres proteínas estructurales y las siete proteínas no estructurales. Posterior a la síntesis de las proteínas virales, las proteínas no estructurales inician la replicación de nuevas cadenas de RNA viral. Este RNA viral es encapsidado por la proteína C para formar la nucleocápside y posteriormente el virus adquiere la membrana a partir del retículo endoplásmico, donde se encuentran heterodímeros de PrM/E.

Después de la encapsidación y la adquisición de la envoltura, el virus viaja por la ruta secretoria y el cambio de pH (*5.8–6.0) en el aparato de Golgi ocasiona la disociación de los heterodímeros PrM/E. Posteriormente, la proteasa celular furina realiza el corte del péptido Pr de M para dar origen al virión maduro. Este virus se libera de la célula y podrá repetir el ciclo de replicación viral en otras células (Idrees & Ashfaq, 2012) (Rodenhuis-Zybert, Wilschut, & Smit, 2010).

2.2 VESICULAS EXTRACELULARES

Las vesículas extracelulares (EVs) son sacos membranosos de contenido heterogéneo que son secretadas por numerosos tipos celulares (Raposo & Stoorvogel, 2013; Tricarico, Clancy, & D'Souza-Schorey, 2017). Estas EVs conforman un mecanismo de comunicación celular importante que participa en la alteración del medio extracelular, así como en la entrega de diferentes moléculas a células distales o proximales, que ocurre bajo condiciones fisiológicas y patológicas como cáncer, enfermedades neurodegenerativas e infecciones virales (D'Souza-Schorey Crislyn & Clancy, 2012; Gangoda, Boukouris, Liem, Kalra, & Mathivanan, 2015; Muralidharan-Chari et al., 2009). El cargo molecular, contenido en estas vesículas, es muy diverso pues incluye receptores celulares, material genético (RNAm y miRNA) así como factores de crecimiento y proteínas transmembranales y citosólicas, entre otras.

El interés en estas microvesículas ha aumentado en la última década debido a su identificación en fluidos corporales (D'Souza-Schorey Crislyn & Clancy, 2012; Gangoda et al., 2015; Muralidharan-Chari et al., 2009). Adicionalmente, las nuevas metodologías para su aislamiento y diferenciación hacen posible su uso como métodos de diagnóstico, marcadores moleculares y estrategias terapéuticas en la investigación biomédica (Agrahari, 2019).

Existe una gran variedad de microvesículas que difieren en origen, tamaño, contenido y composición molecular. Sin embargo, hasta la fecha, no se cuenta

con una clasificación clara que permita diferenciarlas (Gould & Raposo, 2013) y se desconoce si existen marcadores moleculares específicos para todos los tipos de microvesículas (Raposo & Stoorvogel, 2013). Es por ello que, actualmente, las microvesículas son diferenciadas preferencialmente de acuerdo a su tamaño y origen subcelular. Con base en ambos criterios, se han definido los siguientes tipos de EVs: (I) los cuerpos apoptóticos (50-5,000nm), que se forman durante la desintegración apoptótica (Kalra et al., 2012); (II) las microvesículas, también denominados ectosomas, (50-1000nm) que geman directamente de la membrana celular (Kalra et al., 2012); y (III) los exosomas (30-150nm) que se originan de los cuerpos multivesiculares provenientes de la vía endosomal (Harding, Heuser, & Stahl, 2013; Kalra et al., 2012; Théry, Zitvogel, & Amigorena, 2002) (Fig. 1).

De los diferentes tipos de vesículas previamente mencionados, los exosomas son el tipo de EVs que mayor atención han recibido puesto que se ha reportado que juegan papeles importantes en numerosas patologías.

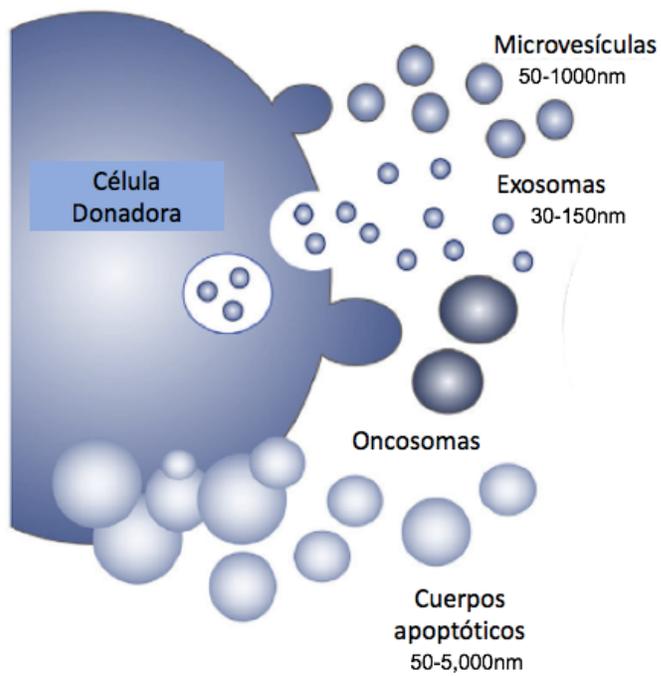


Figura 1. Tipos de Vesículas

Extracelulares. Existen 4 tipos de EVs bien definidos: exosomas, microvesículas (MVs) y cuerpos apoptóticos. Estos difieren en tamaño y en origen de biogénesis.

Modificada de C. Quezada et al. / Molecular Aspects of Medicine 60 (2018) 38e51.

2.3 EXOSOMAS

El término “exosoma” ha sido empleado de tres diferentes maneras. En un principio, se utilizó para describir cualquier vesícula que fuera liberada por las células al medio extracelular que pudiera tener alguna relevancia fisiológica, independientemente de su forma, tamaño u origen. Posteriormente, el término también fue utilizado para hacer referencia a aquellas vesículas relativamente pequeñas (~50 nm de diámetro) originadas de cuerpos multivesiculares (MVBs) formados en la vía endosomal. Finalmente, el uso empírico de la palabra exosoma se basó en el diferencial de centrifugación y los describe como partículas que sedimentan únicamente a alta velocidad de centrifugación (de 70 a 100,000 x g). Aunque los tres términos siguen siendo empleados en la actualidad, en el presente trabajo, se utilizará el término que considera su biogénesis, así como propiedades morfológicas, de composición y tamaño.

Los exosomas son el tipo de EVs de menor tamaño (30–150nm), presentan forma redonda y bien delimitada o una forma de copa tras su tratamiento para la tinción negativa (Conde-Vancells et al., 2008). Debido a su origen endosomal, los exosomas poseen una composición proteica y lipídica única que permite su identificación y aislamiento de otras EVs.

La composición de membrana de los exosomas incluye principalmente colesterol, esfingolípidos, glicerosfosfolípidos y ceramida así como proteínas intraluminales y transmembranales cuya orientación es la misma que presentan

en la membrana plasmática (Villarroya-Beltri et al., 2014). Independientemente del tipo celular del cual provengan, en su mayoría, los exosomas contienen proteínas que participan en eventos celulares como la fusión, la biogénesis de cuerpos multivesiculares MVBs (Alix and TSG101) procesos que incluyan tetraspaninas (CD9, CD81, CD63) y proteínas asociadas como integrinas, inmunoglobulinas y receptores de factores de crecimiento; así como proteínas de citoesqueleto (actina, tubulina), proteínas asociadas a al complejo de asociación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) (Alix, TSG101); proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90), y proteínas que participan en el tráfico vesicular como Rab GTPasas, anexinas y flotilina. Estas proteínas generalmente son empleadas como marcadores de exosomas. (Akers et al, 2013; Jansen et al., 2009; Théry et al., 2002). Además de proteínas, el contenido de los exosomas también se encuentra enriquecido con RNA pequeños (vaultRNA, tRNA y miRNAs). Finalmente, los exosomas pueden contener componentes que reflejen la naturaleza e incluso el estado de la célula que los produce (Villarroya-Beltri et al., 2014).

En años recientes, los exosomas han recibido especial atención, pues se ha descubierto que juegan un papel importante en la comunicación celular tanto bajo condiciones fisiológicas como patológicas. Adicionalmente, se sabe que los exosomas pueden ser aislados de cualquier fluido corporal, lo que los hace candidatos para el análisis de biopsias no invasivas (Cui, 2018) así como un buen recurso para el diagnóstico clínico (Ludwig, Whiteside, & Reichert, 2019). Además, tienen el potencial de funcionar como vehículos para la entrega de

fármacos (Hong, Muller, Whiteside, & Boyiadzis, 2014). Por el otro lado, también se ha observado que los exosomas se ven implicados en la resistencia a medicamentos y en la reprogramación del microambiente de tejidos durante numerosas enfermedades (Azmi, Bao, & Sarkar, 2013). También, se ha observado que, durante las infecciones virales, los exosomas pueden jugar un papel pro-infectivo dentro del organismo.

2.3.1 BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS

Los exosomas provienen de la vía endosomal. Al formarse un endosoma, éste puede madurar hacia un endosoma tardío o bien formar un cuerpo multivesicular (MVB). La formación de estos cuerpos multivesiculares se lleva a cabo por medio de invaginaciones de la membrana endosomal hacia el lumen para formar pequeñas vesículas intraluminales (ILVs). Durante la formación de estas invaginaciones, las ILVs pueden adquirir el cargo. Posterior a la formación del MVB, el destino de este organelo puede ser la degradación por la fusión al lisosoma o bien fusionarse con la membrana plasmática y expulsar estas ILVs al medio extracelular. Cuando las ILVs se encuentran fuera de la célula, entonces reciben el nombre de exosomas (Fig. 2).

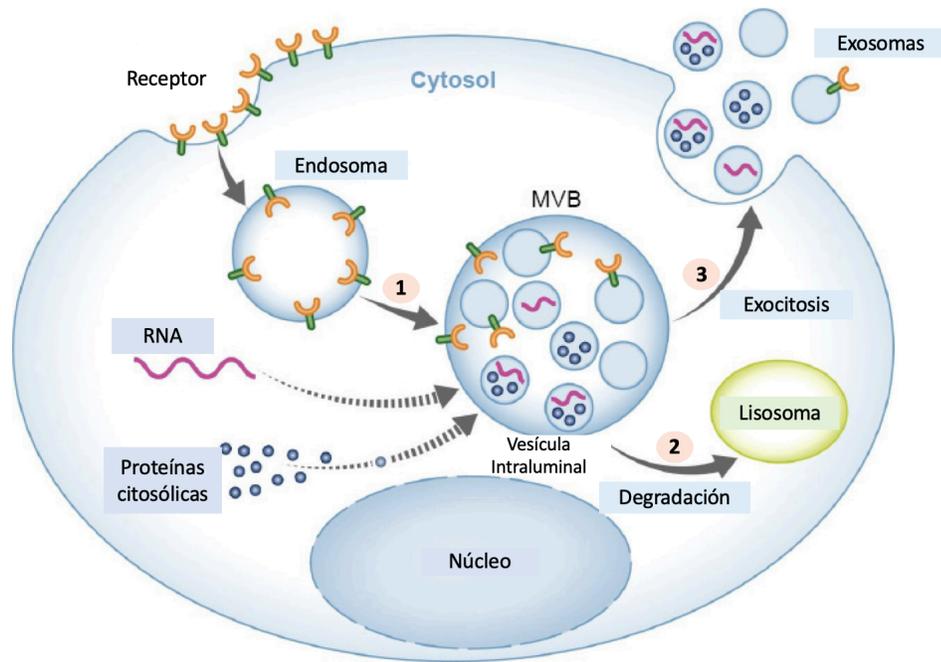


Figura 2. Biogénesis de Exosomas. Tras formarse el endosoma, se forman invaginaciones de la membrana endosomal al interior del lumen del endosoma para formar vesículas intraluminales. La formación de las ILVs puede ser dependiente o independiente de ESCRT y durante este paso se recluta el cargo (1). Al formarse las ILVs, el endosoma adquiere el nombre de cuerpo multivesicular. Posteriormente, el MVB puede fusionarse con el lisosoma y se degradado (2) o bien fusionarse con la membrana plasmática y expulsar las ILVs al medio externo en forma de exosomas (3). Modificado de Hessvik & Llorente (Hessvik & Llorente, 2018).

Aunque se tiene claro que los exosomas provienen de las ILVs de los MVBs, aún no queda claro con exactitud cual es el mecanismo que determina la composición del cargo de los exosomas. Sin embargo, se sabe que varias vías parecen participar en este proceso: la vía dependiente de ESCRT y la independiente de ESCRT, en la que participan tetraspaninas y lípidos.

ESCRT es un complejo dividido en varios complejos de proteínas (ESCRT-0, -I, -II, -III y -IV) que participa en la formación de los ILVs y en la entrega de proteínas ubiquitinadas a los ILVs de los cuerpos multivesiculares, que luego son degradados al fusionarse con el lisosoma (Henne, Buchkovich, & Emr, 2011). Sin embargo, actualmente no se sabe si ESCRT también determina el cargo de las ILVs que serán liberadas al medio externo como exosomas. ESCRT-0 reconoce proteínas ubiquitinadas y es reclutado a la membrana endosomal por medio de la interacción del dominio Hrs FYVE con el fosfatidil inositol 3-fosfato (PIP3). Posteriormente, ESCRT-0 recluta el complejo ESCRT-I por medio de la interacción del dominio Hrs PSAP con la subunidad Tsg101 de ESCRT-I. Luego, ESCRT-I recluta proteínas de ESCRT-II, el cual recluta y activa el complejo de ESCRT-III. La proteína Snf7 del complejo ESCRT-III forma ensamblajes oligoméricos que promueven la gemación de la membrana endosomal. Snf7 también recluta la proteína adaptadora Alix la cual estabiliza el ensamblaje de ESCRT-III. Finalmente, Vps4 provee la energía necesaria para disociar el complejo de ESCRT-III (Henne et al., 2011). Interesantemente, los exosomas purificados de diferentes tipos celulares presentan grandes cantidades de proteínas ESCRT así como proteínas ubiquitinadas (Buschow, Liefhebber, Wubbolts, & Stoorvogel, 2005). Alix, por ejemplo, comúnmente es un cargo de exosomas y un marcador importante.

Por otro lado, también se ha demostrado que existe otra vía para la formación de exosomas que es independiente de ESCRT, pues se ha

observado que la secreción de exosomas con proteolípidos (PLP) no se ve afectada por el silenciamiento de Hrs, Alix o Tsg101 (Trajkovic et al., 2008). Algunos reportes indican que la ceramida causa la curvatura espontánea de la membrana endosomal y la coalescencia de microdominios. Estos reportes pueden explicar la gemación de los ILVs; sin embargo, no explica como el cargo es selectivamente entregado a las vesículas (Villarroya-Beltri et al., 2014).

Las tetraspaninas son proteínas integrales de membrana presentes en los exosomas. Estas proteínas presentan cuatro pases transmembranales y un dominio citosólico. En estudios anteriores se ha demostrado que estas tetraspaninas pueden interaccionar con ciertas proteínas y reclutarlas dentro de los ILVs (Villarroya-Beltri et al., 2014). La tetraspanina CD81 juega un rol importante en la composición exosomal por medio del interactoma de su dominio citoplasmático. De manera similar, la metaloproteinasa CD10 en exosomas depende de la interacción con la tetraspanina CD9 (Mazurov, Barbashova, & Filatov, 2013). Otra tetraspanina, CD63, controla la entrada de LMP1 a los exosomas (Verweij et al., 2011). De esta manera, se presenta otra vía para el reclutamiento del cargo sin la necesidad de la maquinaria ESCRT.

Dado que el contenido de los MVBs es bastante heterogéneo, se ha llegado a pensar que existen diferentes subpoblaciones de MVBs y que el destino de estos está determinado por su composición. Posterior a la formación de

los MVBs, estos pueden fusionarse al lisosoma y ser degradados o bien fusionarse a la membrana plasmática y liberar los exosomas al medio externo (Hessvik & Llorente, 2018). Aunque se sabe que gran cantidad de MVBs continuamente se fusionan a los lisosomas, también se ha observado que existen mecanismos que previenen esta fusión, permitiendo que los MVBs funcionen como un organelo de almacenamiento temporal (Simons & Raposo, 2009).

Por otro lado, aunque se ha propuesto que el destino de los MVBs depende de la composición molecular, hasta ahora no queda claro cual o cuales son exactamente los mecanismos que determinan la fusión de los MVBs a la membrana plasmática para la consecuente liberación de los exosomas.

2.3.2 DESTINO EXOSOMAL

Posterior a la formación de los MVBs, los exosomas son liberadas al medio extracelular o bien a los fluidos corporales (orina, suero, saliva, etc.) (Simons & Raposo, 2009). Una vez fuera de la célula de origen, los exosomas pueden presentar diferentes funciones fisiológicas en el organismo. Pueden funcionar como un medio de excreción de proteínas y moléculas no necesarias en células con bajas capacidades degradativas. También participan como potenciadores de eventos fisiológicos como la coagulación e incluso se ha observado que pueden facilitar la migración celular y la liberación de quimio-atrayentes. Sin embargo, su característica más distintiva es que son capaces de interactuar específicamente con otra célula, generando una respuesta biológica o cambio de comportamiento en la célula blanco. Actualmente, se consideran a los exosomas un tipo específico de comunicación intercelular capaz de llevar información a células blanco cercanas y distales.

El cargo contenido en los exosomas puede ser entregado a las células blanco por medio de tres diferentes maneras: la primera es por medio de la interacción receptor-ligando y la consecuente activación de vías de señalización, en la cual no es necesaria la internalización del exosoma a la célula blanco; la segunda es por medio de la fusión directa de membranas y la entrada del cargo exosomal al citoplasma de la célula receptora; por último la entrega del cargo ocurre luego de la internalización de los exosomas por

medio de la endocitosis y de la fusión de la membrana exosomal con la membrana del endosoma (Fig. 3) (K. McKelvey et al., 2015; T. Tian et al., 2010; Y. Zhang et al., 2019).

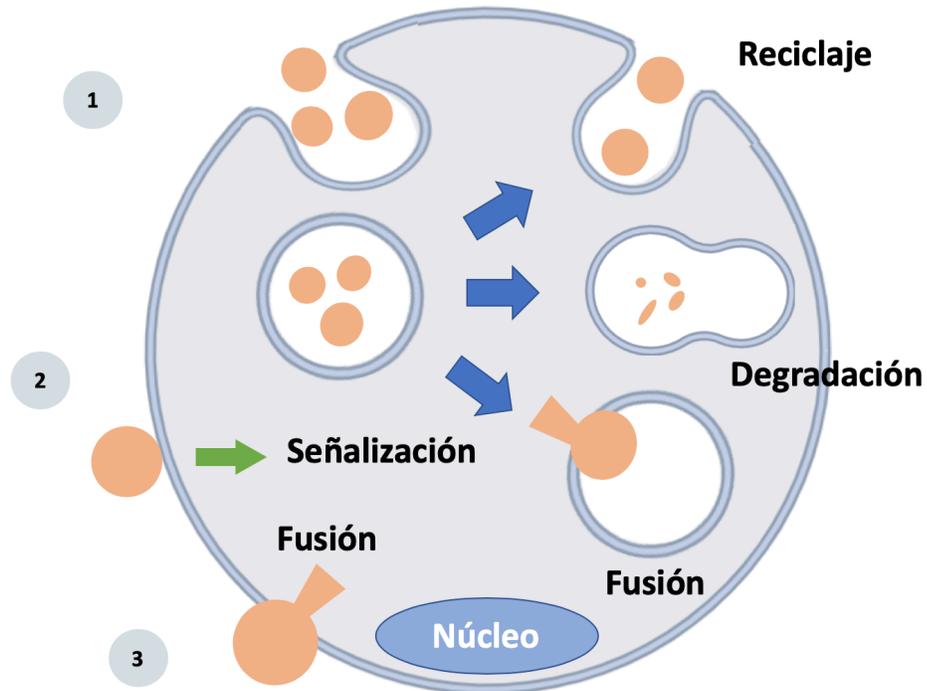


Figura 3. Entrega del cargo a la célula blanco. El cargo de un exosoma puede ocasionar una respuesta en la célula blanco por medio de tres maneras. Los exosomas pueden ser endocitados por la célula blanco y posteriormente ser expulsados nuevamente al medio extracelular, ser degradados por la fusión del endosoma al lisosoma o bien la membrana exosomal puede fusionarse con la membrana endosomal y liberar el cargo del exosoma al citoplasma (1). Por otro lado, los exosomas pueden llevar receptores o ligandos que permitan desencadenar vías de señalización en la célula blanco sin la necesidad de la internalización del exosoma o del cargo (2). Por último, los exosomas pueden fusionarse directamente a la membrana plasmática de la célula blanco y expulsar el cargo en el citoplasma celular (3). (Modificado de Quezada et al., 2018)

Entre las funciones que pueden generar el cargo entregado se encuentra la transferencia horizontal de genes, la estimulación de vías por medio de ligandos, la transferencia de receptores activados y la reprogramación epigenética de la célula blanco, entre otras. Esto resulta en un tipo de comunicación específica entre las células parentales y las células blanco proximales y distales por medio de la amplificación de los exosomas (Y. Zhang et al., 2019).

2.3.3 EXOSOMAS EN INFECCIONES VIRALES

Los exosomas actúan como moduladores para mantener la homeostasis en el organismo. Sin embargo, durante diversas patologías e infecciones, la función de estas microvesículas puede ser modificada.

Se ha demostrado que los exosomas presentan una función dual durante las infecciones virales. La comunicación celular mediada por exosomas puede resultar en la facilitación de la diseminación de la infección o bien en su limitación. De esta forma, los exosomas pueden tener una acción tanto proviral como antiviral dependiendo del cargo que posean y del estado de la célula del que se originen (W. Zhang et al., 2018). Existen numerosos ejemplos reportados que comprueban esta dualidad de los exosomas durante las infecciones virales.

Se ha observado que exosomas provenientes de células infectadas con el virus Herpes Humano 6 (HHV-6) contienen viriones maduros capaces de infectar células sanas (Mori et al., 2008); adicionalmente, también se ha demostrado que los exosomas contienen proteínas funcionales del tegumento que pueden aumentar la infectividad del DNA viral durante esta infección (Dargan & Subak-Sharpe, 1997). En otro estudio se observó que exosomas provenientes de células infectadas por el virus Epstein Barr (EBV) contienen reguladores inflamatorios como IL-1B, IL-18 e IL-33 (Ansari et al., 2013) así como mRNAs virales (Gallo et al., 2017). Además, existen reportes de que exosomas derivados de células infectadas por retrovirus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus linfotrófico T humano (HTLV) son capaces de emplear la maquinaria exosomal como mecanismo de transmisión viral en donde el virus no requeriría la existencia de un receptor.

Particularmente, el papel que tienen los exosomas durante las infecciones por flavivirus también ha sido reportado. Un estudio mostró que exosomas derivados de células neuronales corticales infectadas con el Zika Virus (ZIKV) son capaces de infectar otras células de la misma línea celular (Zhou, Woodson, Sherman, Neelakanta, & Sultana, 2019). Adicionalmente, en otro estudio realizado en células dendríticas, se demostró que los exosomas producidos por células infectadas por el serotipo 3 del virus dengue (DENV-3) son capaces de infectar células sanas y que estos exosomas poseen RNA viral infeccioso (Martins, Kuczera, Lötvall, Bordignon, & Alves, 2018). Interesantemente, Reyes y colaboradores, empleando una línea celular

proveniente de larva de mosquito *Aedes albopictus* C6/36, reportaron que los exosomas secretados por células infectadas con el serotipo 2 del virus del dengue (DENV-2) presentan mayor tamaño, contienen partículas tipo viral y son capaces de infectar células sanas de la misma línea celular (Reyes-Ruiz et al., 2019). Por otro lado, otro estudio en células de garrapata *Ixodes capularis* ISE6 demostró que exosomas derivados de células infectadas con el Virus Langat (LGTV) transportan RNA viral e infectan células sanas (Zhou et al., 2018). Además de ello, también reportaron que EVs procedentes de células de mosquito infectadas por DENV-2 infectan células de queratinocitos humanos.

Aunque la evidencia señala que las EVs, particularmente lo exosomas, son importantes durante las infecciones por flavivirus, aún no ha sido reportado si los exosomas provenientes de células de invertebrado infectadas por DENV-2 son capaces de infectar células humanas. Adicionalmente, hasta la fecha, aún no ha sido esclarecida la posible vía por la cual el cargo infeccioso de estos exosomas es entregado a las células blanco. En este trabajo se pretende estudiar la capacidad infectiva de exosomas provenientes de células infectadas de la línea celular de larva de mosquito C6/36 en células humanas hepáticas HUH-7.

3. JUSTIFICACIÓN

El Dengue es la enfermedad viral más importante del mundo transmitida por mosquitos. Actualmente no existe una vacuna que ofrezca protección a largo plazo contra los cuatro serotipos de DENV y su incidencia ha aumentado en las últimas décadas (OMS, 2019).

Recientemente, las EVs han recibido gran interés debido a su participación en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Particularmente, se ha demostrado que los exosomas juegan un papel importante en las infecciones por DENV (Martins et al., 2018; Reyes-Ruiz et al., 2019) permitiendo la transmisión y la persistencia viral. Es por ello que son necesarios más estudios que permitan determinar con mayor precisión el papel que juegan los exosomas durante las infecciones virales como las ocasionadas por DENV.

4. HIPÓTESIS

En estudios previos se ha reportado que, durante diferentes infecciones virales, los exosomas secretados por células infectadas son capaces de infectar células sanas del mismo linaje. Sin embargo, se desconoce si los exosomas provenientes de células de mosquito infectadas por DENV-2 de mosquito sean capaces de infectar células de mamífero. Es por ello que en este trabajo se postula que exosomas secretados por células de mosquito infectadas por DENV-2 poseen la capacidad de infectar de manera aguda, células de mamífero HUH-7.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterización del contenido viral de los exosomas secretados por las células de la línea de mosquito C6/36.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar las condiciones de aislamiento de exosomas provenientes de las células C6/36.
- Identificar proteínas o componentes virales en exosomas obtenidos de células infectadas C6/36.

6. MÉTODOS

6.1 CULTIVO CELULAR

Las dos líneas celulares empleadas en el trabajo fueron crecidas bajo diferentes condiciones:

- **C6/36:** Células procedentes de larva de mosquito *Aedes albopictus* fueron sembradas utilizando medio MEM con piruvato de sodio y glutamina (GIBCO), adicionado con penicilina-estreptomicina (concentración final de penicilina 10 u/ml y 10ug/ml de estreptomicina), 7% de SFB y solución de vitaminas 1x (GIBCO).
- **HUH-7:** Células procedentes de hepatocarcinoma humano (HUH-7) fueron crecidas empleando medio DMEM Dulbecco Advanced™ adicionado con glutamina 200mM (10ml/L), penicilina-estreptomicina (concentración final de penicilina 10u/ml y 10ug/ml de estreptomicina), 7% SFB y 0.5x de solución fungizona.

6.2 TITULACIÓN VIRAL

Se realizaron diluciones seriadas del virus DENV-2 obtenido del extracto de cerebro de ratón diluido en medio HANKS GIBCO (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}). Se tomaron 200ul de cada dilución para infectar células de la línea BHK-21 al 70% de confluencia, sembradas en placas de 24 pozos. La infección se mantuvo durante dos horas a 37°C. Posteriormente, se agregó 1ml de carboximetilcelulosa al 1.7% con medio DMEM completo y la infección se permitió durante 5 días a 37°C. A continuación, la monocapa celular se tiñó con el azul Blue Black para el conteo de unidades formadoras de placa. El título viral se expresó en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml)

6.3 INFECCIÓN DE CÉLULAS C6/36

Se infectaron células C6/36 sembradas en cajas de 75 mm² a una MOI de 1 con DENV-2 en medio DMEM sin suero durante dos horas. Finalizado el tiempo, se añadió medio DMEM suplementado con suero depletado de vesículas extracelulares y la infección se mantuvo durante 72 h. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante para la obtención de exosomas.

6.4 OBTENCIÓN DE EXOSOMAS

6.4.1 AISLAMIENTO A PARTIR DEL SOBRENADANTE CELULAR

Se recolectó el sobrenadante de las células C6/36 infectadas y no infectadas.

Se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos para eliminar células muertas y otros restos celulares y se filtró a través de un filtro de 0.22µm.

Posteriormente, se emplearon tres diferentes metodologías para la extracción de exosomas publicadas en trabajos anteriores:

- **Cochón de Sacarosa:** Se colocaron 2 ml de sacarosa diluida en PBS 1x al 30% en tubos de ultracentrífuga (tubos de policarbonato 26.3mL – Beckman Coulture). Posteriormente, se colocó cuidadosamente el sobrenadante previamente filtrado para mantener las dos fases claramente separadas. Se ultracentrifugó a 100,000 x g durante 1 hora a 4°C. A continuación, se desechó el sobrenadante por decantación y se resuspendió la pastilla (porción rica en exosomas) en 200mL de PBS 1x.
- **Ultracentrifugación directa:** Se colocaron 20mL de sobrenadante previamente filtrado en tubos de ultracentrífuga. Se ultracentrifugó a 100,000 x g durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante por decantación y se resuspendió la pastilla (porción rica en exosomas) en 200mL de PBS 1x.
- **Total Exosome Extraction:** Se colocaron 20mL de sobrenadante previamente filtrado en tubos de ultracentrífuga. Se ultracentrifugó a 100,000 x g durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se desechó el

sobrenadante por decantación y se resuspendió la pastilla (porción rica en exosomas) en 200mL de PBS 1x. Se agregaron 100mL del reactivo Total Exosome Extraction y se incubó a 4°C durante toda la noche. A continuación, se centrifugó a 10,000 x g durante 30 minutos y se recuperó la pastilla que fue nuevamente resuspendida en 200mL de PBS 1x (de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

6.4.2 INMUNOPRECIPITACIÓN DE EXOSOMAS

Posterior al aislamiento empleando el cochón de sacarosa y para garantizar una muestra de exosomas más pura, se procedió a inmunoprecipitar los exosomas. Para ellos se emplearon las perlas magnéticas Dynabeads (Exosome Immunoprecipitation – Protein A) de Invitrogen Technologies. Estas perlas fueron resuspendidas en presencia de anticuerpo anti-CD9 en 200µl PBS-TWEEN durante 10 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después, la muestra fue colocada en el magneto durante un minuto para preservar las perlas acopladas al Ab-CD9 y se descartó el exceso. Posteriormente, se resuspendió el complejo PERLAS-CD9 con 200µl de PBS-TWEEN mezclados con la muestra de exosomas. La muestra fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se empleó nuevamente el magneto para lavar tres veces la muestra con el complejo PERLAS-CD9-EXOSOMAS. Se añadieron 200ul del buffer de elución (Glicina 50mM, pH 2.8) y se incubó durante dos minutos para disociar el complejo. Finalmente, los exosomas eluidos se colocaron en un tubo nuevo para luego ser analizados.

6.5 WESTERN BLOT

6.5.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se realizó una solución RIPA + inhibidores de proteasas (25x) para obtener una concentración final de inhibidor de proteasas al 1X. Se agregaron 100ul de la solución RIPA + Inhibidor de proteasas a las muestras de exosomas obtenidas con las diferentes metodologías de extracción.

Posteriormente, las muestras fueron sonicadas al 100% durante 30 segundos y 30 segundos de descanso. Inmediatamente después, las muestras fueron sumergidas en nitrógeno líquido hasta ser congeladas y luego se incubaron a 95°C hasta derretirse. Este ciclo de sonicación y choque térmico fue repetido 3 veces para garantizar la obtención de proteínas y la correcta disgregación de las membranas de los exosomas.

6.5.2 INMUNOBLOTEO

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS al 13% en donde se sometieron a electroforesis 20ug de proteína empleando el buffer de carga reductor RIPA (150mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% deoxicalato de sodio, 0.1% SDS, 50 nM Tris, pH 8.0). Las muestras fueron sometidas a 120 volts. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 20 volts durante 45 minutos empleando una cámara semi-

húmeda y un Buffer de transferencia (48 mM Tris base, 39 mM glicina y 20 % metanol).

La membrana se bloqueó con leche al 10% durante 1 hora y se incubó con anticuerpos dirigidos contra las tetraspaninas CD9 (1:300) (anticuerpo monoclonal anti CD9 hecho en ratón no. catálogo: sc-59140), CD81 (1:300) (anticuerpo monoclonal anti CD9 hecho en conejo no. catálogo: sc-109201), Calnexina (1:1000) (anticuerpo policlonal anti Calnexina hecho en cabra no. catálogo sc-6465) o NS3 (GTX124252) durante toda la noche a 4°C. Finalmente, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS-Tween (0.1%) con NaCl (150mM). A continuación, se incubó durante 1 hora con los anticuerpos secundarios, goat anti-ratón o goat anti-conejo respectivamente, acoplados a HRP (1:6,000). Finalmente, las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia empleando el sustrato Super Signal West Femto (Thermo Scientific).

7. RESULTADOS

7.1 CONFIRMACIÓN DE PUREZA E IDENTIDAD DE LOS EXOSOMAS OBTENIDOS DE LA LÍNEA CELULAR C6/36

El primer paso para poder probar la infectividad de los exosomas en células de mamífero fue tener una buena preparación que además no estuviera contaminada con virus. Para ello, se emplearon tres diferentes técnicas de obtención de exosomas: Colchón de Sacarosa, Ultracentrifugación directa y uso del kit comercial Total Exosome Extraction.

Para comprobar que las técnicas de purificación de exosomas fueron exitosas, se realizó un ensayo de Western-blot, empleando anticuerpos contra moléculas características de los exosomas como las tetraspaninas. Las tetraspaninas son proteínas transmembranales abundantes en vesículas extracelulares que se organizan en regiones membranales ricas en colesterol llamadas microdominios ricos en tetraspaninas (TEMs). Tanto CD9 como CD63 (25kDa) son tetraspaninas consideradas como marcadores de exosomas y generalmente son utilizadas para su aislamiento (Khushman et al., 2017). Una forma sencilla de conocer la presencia de exosomas en una preparación es identificar a CD9 y CD63. Dado que pudimos identificar la presencia de ambas tetraspaninas en los exosomas aislados con la técnica del colchón de sacarosa y de la ultracentrifugación directa, estas técnicas podrían ser consideradas como adecuadas para el aislamiento de

exosomas. Por otro lado, no se observó marca de CD9 ni de CD63 cuando se usó el kit de Total Exosome Extraction, sugiriendo que, mediante esta técnica, la extracción de exosomas no era adecuada. (Fig. 4).

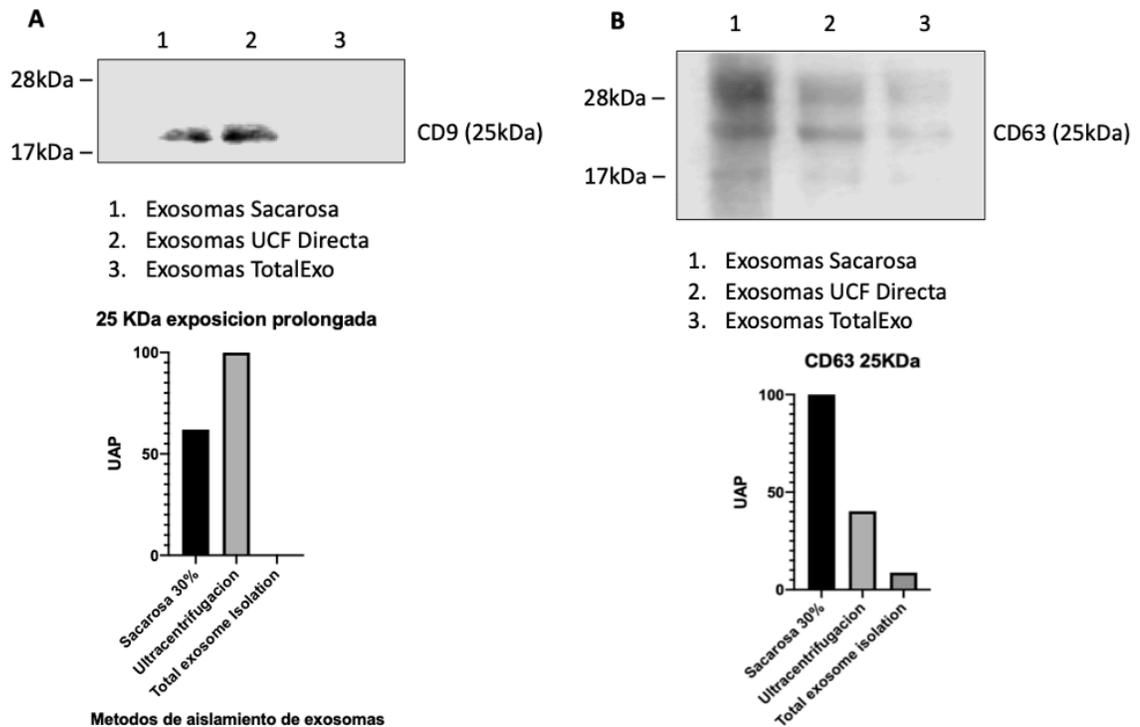


Figura 4. Detección de tetraspaninas CD9 y CD63 en exosomas derivados de células infectadas C6/36. Las proteínas extraídas de exosomas purificados por colchón de sacarosa 30% (carriles 1); Ultracentrifugación (carriles 2) y Total Exosome Isolation (carriles 3) fueron sometidas a electroforesis en PAGE-SDS y a análisis por Western-blot usando anticuerpos dirigidos contra las tetraspapasinas CD9 (A) y CD63 (B). Del lado izquierdo se muestra la migración de los marcadores de peso molecular. El análisis densitométrico de las bandas de las tetraspapasinas se muestra en la parte inferior.

Una vez que confirmamos que en las preparaciones teníamos exosomas, decidimos analizar la pureza de la preparación. Para ello, las proteínas purificadas de los exosomas se sometieron a análisis por Western-blot usando un marcador negativo de exosomas como lo es el marcador de Retículo endoplásmico Calnexina. Dado que en ninguna de las tres preparaciones de exosomas se detectó la presencia de Calnexina, y sin embargo, fue claramente observada en el extracto total de células C6/36 (Fig. 5), esto confirmó que la preparación de exosomas no estaba contaminada con membranas del retículo endoplásmico.

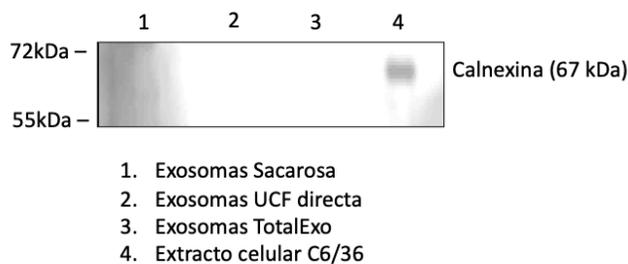


Figura 5. Detección de Calnexina en las preparaciones de exosomas purificados de células C6/36 infectadas con DENV2. Las

proteínas presentes en los exosomas purificados de células C6/36 infectadas con DENV por colchón de sacarosa (carril 1), por ultracentrifugación (carril 2), y usando el kit Total Exosome Extraction (carril 3), además del extracto citoplasmático total de células C6/36 se analizaron por Western-blot usando anticuerpos dirigidos contra la proteína Calnexina. Del lado izquierdo se muestra la migración de los marcadores de peso molecular.

7.2 Detección de EVs de 50 nm en células C6/36 infectadas con DENV-2

Con el fin de confirmar la presencia de exosomas y considerando que la técnica del colchón de sacarosa nos daba más rendimiento, se sometió esta preparación a análisis por microscopía electrónica de transmisión. Las muestras de exosomas fueron procesadas para su análisis por medio de la técnica de la tinción negativa (Fig. 6). Se obtuvieron 10 campos diferentes con un total de 49 vesículas y se empleó el programa ImageJ para determinar su diámetro. Las imágenes obtenidas de los diferentes campos mostraron la presencia de estructuras membranosas de forma circular o de copa de un tamaño promedio de ~50 nm.

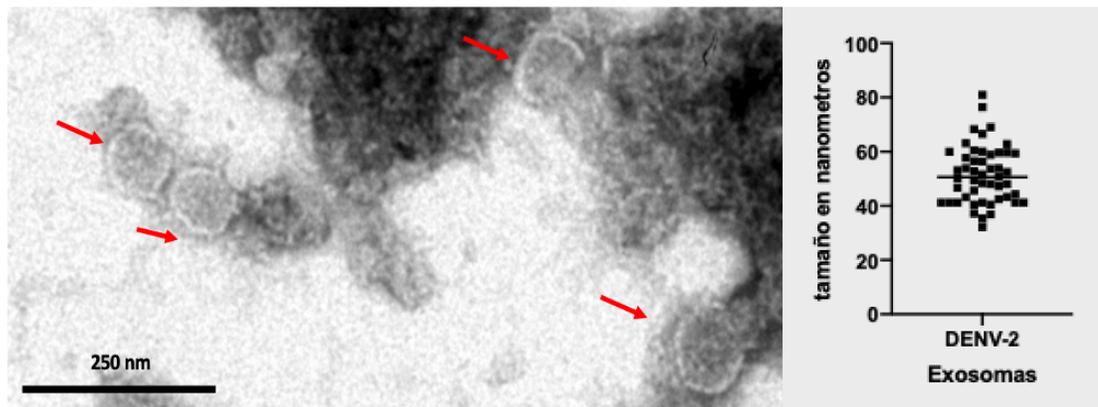


Figura 6: Exosomas analizados mediante tinción negativa por microscopía electrónica de transmisión. Los exosomas purificados por la técnica de colchón de sacarosa fueron concentrados y analizados por microscopía electrónica de transmisión. Se presenta una imagen representativa de los exosomas observados. Se realizó un análisis del diámetro de los exosomas purificados mediante su medición en 10 campos diferentes (n=49).

7.3 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES E Y NS3 EN EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS C6/36 INFECTADAS CON DENV-2

Con el objetivo de detectar la presencia de proteínas virales en la preparación de exosomas, se realizó un ensayo de Western-blot usando anticuerpos anti la proteína E. Inicialmente, se probó este anticuerpo E en extractos citoplásmicos de células C6/36 no infectadas e infectadas con DENV-2. Como era de esperarse, el anticuerpo anti-E detectó la presencia de la proteína viral E únicamente en el extracto de células infectadas (Fig. 7).

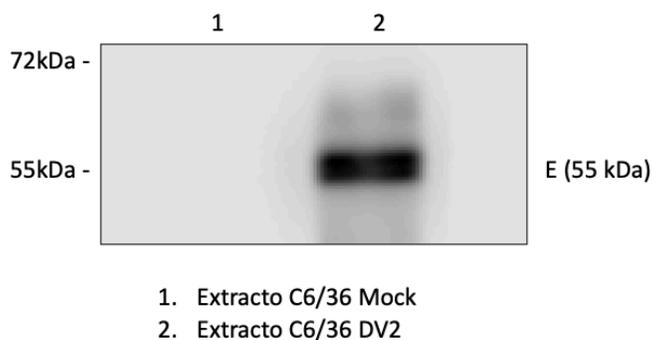


Figura 7. Detección de proteína E en extracto de células infectadas con DENV-2. Extractos citoplásmicos totales de células no infectadas (carril 1) e infectadas (carril 2)

fueron sometidos a Western-blot usando anticuerpos anti-E. En el lado izquierdo de la figura se muestra la migración de los marcadores de peso molecular.

Cuando las proteínas de exosomas purificados por colchón de sacarosa y por ultracentrifugación se analizaron por Western-blot con el anticuerpo anti-E, se encontró que esta proteína estuvo presente en ambas preparaciones de exosomas provenientes de células infectadas, pero no en los exosomas

provenientes de células no infectadas. Estos resultados sugieren que los exosomas de células infectadas contienen a la proteína E

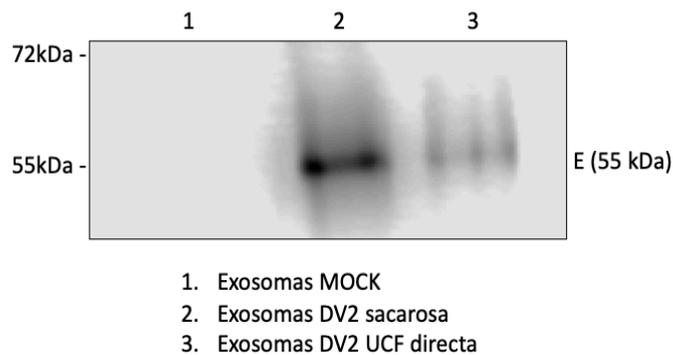


Figura 8. Detección de proteína E en exosomas derivados de células C6/36 infectadas con DENV-2. Las proteínas purificadas de exosomas provenientes de

células no infectadas (carril 1) o de células infectadas (carriles 2 y 3) purificadas por colchón de sacarosa (carril 2) o por ultracentrifugación (carril 3) fueron analizadas por Western-blot usando anticuerpos contra la proteína E. La migración de los marcadores de peso molecular se muestra del lado izquierda de la figura.

Considerando la posibilidad de que la detección de la proteína viral E podría deberse a una contaminación de partículas virales libres en la muestra de exosomas y no a la presencia de esta proteína en su interior, se realizó una inmunoprecipitación de los exosomas empleando el marcador CD9. Para ello, se emplearon las DYNABEADS y se siguió el procedimiento del fabricante.

Una vez inmunoprecipitados los exosomas, la presencia de la proteína E se analizó nuevamente por Western-Blot. Como puede verse en la Figura 9, la proteína E fue claramente detectada en tres diferentes preparaciones

inmunoprecipitadas de células infectadas, pero no así en los exosomas precipitados de células no infectadas. Este resultado confirma que la proteína E está presente en los exosomas de células infectadas con DENV

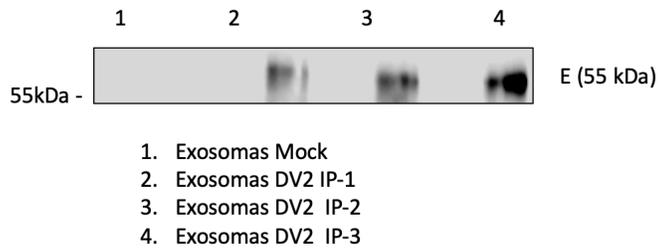


Fig. 9: Detección de proteína viral E en exosomas CD9+ derivados de células C6/36 infectadas con DENV-2 Las proteínas

purificadas de exosomas inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CD9 provenientes de células no infectadas (carril 1) o de células infectadas (carriles 2, 3 y 4), purificadas por colchón de sacarosa, fueron analizadas por Western-blot usando anticuerpos contra la proteína E. La migración de los marcadores de peso molecular se muestra del lado izquierdo de la figura.

Además de confirmar la presencia de la proteína viral estructural E en los exosomas liberados de células infectadas, quisimos saber si también podrían secretarse proteínas virales no estructurales por esta vía. Para analizar esta posibilidad, se probó la presencia de la proteína viral NS3. Para ello, las proteínas presentes en los exosomas obtenidos por inmunoprecipitación, se analizaron mediante ensayos de Western-blot, usando anticuerpos anti-NS3. Como puede verse en la Figura 10, la proteína NS3 fue detectada en los exosomas provenientes de las células C6/36 infectadas con DENV-2 y como se esperaba, estuvo ausente en los exosomas derivados de células no infectadas.

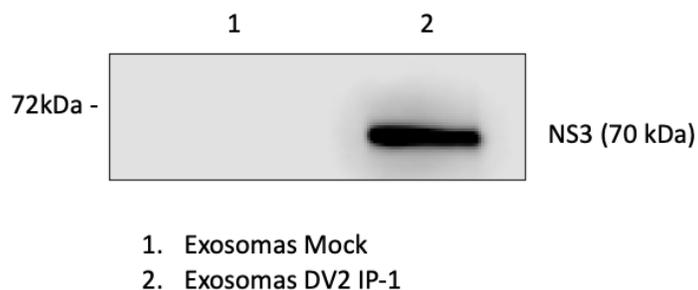


Figura 10. Detección de proteína viral E en exosomas CD9+ de C6/36 infectadas con DENV-2.

Las proteínas purificadas

de exosomas inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CD9 provenientes de células no infectadas (carril 1) o de células infectadas (carril 2) purificadas por colchón de sacarosa (carril 2) fueron analizadas por Western-blot usando anticuerpos contra la proteína NS3. La migración de los marcadores de peso molecular se muestra del lado izquierda de la figura.

8. DISCUSIÓN

Los exosomas son un tipo de EVs secretados por distintos tipos celulares que se encuentran en fluidos corporales como suero, saliva (Lässer et al., 2011), orina (Li et al., 2014) e incluso leche materna (Liao, Du, Li, & Lönnnerdal, 2017). Al igual que las EVs, los exosomas contienen un cargo molecular heterogéneo formado por proteínas, receptores, lípidos y material genético. Se ha visto que este contenido puede ser transportado y entregado a otras células en el organismo, modificando el fenotipo de las células blanco. Es por ello que las EVs son consideradas como un elemento de comunicación celular.

El reciente interés en el estudio de las EVs, como los exosomas, se debe a que se ha reportado que estas tienen papeles importantes en numerosas patologías como cáncer (Guo et al., 2017), enfermedades neurodegenerativas (Jan et al., 2017) y enfermedades infecciosas (Hosseini, Fooladi, Nourani, & Ghanezadeh, 2013). Particularmente, en el caso de las infecciones virales, se ha reportado que los exosomas provenientes de células infectadas pueden llevar y entregar componentes virales como partículas virales (Reyes-Ruiz et al., 2019), proteínas (Pleet, DeMarino, Lepene, Aman, & Kashanchi, 2017) o material genético viral (Zhou et al., 2019) a células vecinas, favoreciendo la propagación del patógeno.

Dengue es un flavivirus transmitido a los humanos principalmente a través de la picadura de mosquitos pertenecientes al género *Aedes*. En estudios recientes se ha asociado la importancia de las EVs en virus de RNA como los flavivirus (Zhou et al., 2018). Estudios con DENV han demostrado que los exosomas provenientes de

células infectadas pueden llevar RNAs virales y pueden infectar células del mismo tipo. Sin embargo, poco se sabe de la capacidad de los exosomas producidos por células de mosquito, para transmitir la infección a células de mamíferos.

En este trabajo, se compararon diferentes metodologías para el aislamiento de exosomas provenientes de la línea celular C6/36. Estas metodologías fueron el colchón de sacarosa al 30% (Gupta et al., 2018), la ultracentrifugación directa (Gould & Raposo, 2013) y el kit comercial TotalExosome Extraction. En los experimentos realizados para la detección de marcadores exosomales en las tres distintas preparaciones de exosomas se encontró a CD9 en los exosomas aislados por el método de la sacarosa al 30% y por ultracentrifugación directa. Sin embargo, no hubo se detectó CD9 en los exosomas aislados por medio del TotalExosome Extraction. Por el contrario, CD63 se detectó en los exosomas aislados por las tres metodologías empleadas. Esta diferencia en la detección de CD63 con respecto a CD9 puede deberse a que la población de exosomas derivados de células C6/36 infectadas con DENV-2 pueden contener a CD63 y en menor proporción CD9. Sin embargo, no puede descartarse que las diferentes técnicas podrían también enriquecer ciertas poblaciones de exosomas.

La presencia de exosomas en la preparación purificada por gradientes de sacarosa se confirmó mediante tinción negativa y su observación bajo el microscopio electrónico de transmisión. De los 9 campos analizados y la medición de 49 vesículas, se encontró que su diámetro medio fue de 50 nm. Interesantemente, en las micrografías obtenidas, no se observaron partículas electrón densas, una

característica de las partículas virales de DENV (50 nm) al interior de las EVs mostradas. Sin embargo, es importante considerar que los exosomas tienen un potencial infectivo durante la infección por DENV y este puede estar dado tanto por la partícula viral completa o bien por el RNAss (+) infectivo al interior de los exosomas. Por tanto, aunque no observamos partículas virales dentro de los exosomas, no se descarta la posibilidad que exista material genético viral infectivo o bien proteínas virales dentro de estas EVs.

Finalmente, se detectó tanto la presencia de la proteína de envoltura E como la proteína no estructural NS3 al interior de exosomas aislados de células de mosquito infectadas con DENV-2, y no en los exosomas derivados de células MOCK. Estos resultados son interesantes pues la presencia de la proteína E sugiere que en los exosomas pueda encontrarse la partícula viral completa, la poliproteína viral o bien esta proteína de manera individual.

Por otro lado, la detección de la proteína NS3, la cual es una proteína citosólica con función de helicasa y proteasa resulta particularmente interesante. En el ciclo de replicación de DENV, NS3 lleva a cabo sus funciones en los complejos de replicación generados durante la infección y esta no forma parte la partícula viral, por lo que no es secretada durante el ciclo replicativo viral. La presencia de una proteína citosólica de origen viral sugiere que al momento de la formación de las ILVs de los MVBs se están agregando componentes virales. Ante este hecho, es posible considerar que el RNA viral pudiera encontrarse en los exosomas secretados por células C6/36 infectadas con DENV2. Por otro lado, estudios

recientes de nuestro laboratorio indican que la proteína NS3 de DENV es translocada a núcleo y participa en la degradación de nucleoporinas alterando el transporte núcleo-citoplasma (de Jesús-González et al., 2020). El efecto que pueda tener la presencia de NS3 en los exosomas en la integridad del complejo de poro nuclear de células receptoras deberá ser evaluado.

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, en este trabajo se demostró que los exosomas derivados de células de mosquito C6/36 infectadas con DENV-2 poseen componentes virales como proteínas estructurales (proteína de envoltura E) y no estructurales (proteína NS3). Esto resulta de suma importancia porque sugiere que este tipo de vesículas potencialmente pueden infectar otros tipos celulares. Adicionalmente, se compararon tres técnicas de aislamiento de exosomas de las cuales la metodología de purificación por colchón de sacarosa al 30% parece ser la más eficiente.

10. REFERENCIAS

- Agrahari, V., Agrahari, V., Burnouf, P. A., Chew, C. H., & Burnouf, T. (2019). Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.012>
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Ansari, M. A., Singh, V. V., Dutta, S., Veetil, M. V., Dutta, D., Chikoti, L., ... Chandran, B. (2013). Constitutive Interferon-Inducible Protein 16-Inflammasome Activation during Epstein-Barr Virus Latency I, II, and III in B and Epithelial Cells. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00805-13>
- Azmi, A. S., Bao, B., & Sarkar, F. H. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review. *Cancer and Metastasis Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9441-9>
- Buschow, S. I., Liefhebber, J. M. P., Wubbolts, R., & Stoorvogel, W. (2005). Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.08.005>
- Colón-González, F. J., Fezzi, C., Lake, I. R., & Hunter, P. R. (2013). The Effects of Weather and Climate Change on Dengue. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002503>
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., ... Falcon-Perez, J. M. (2008). Characterization and comprehensive

- proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/pr8004887>
- Cui, S., Cheng, Z., Qin, W., & Jiang, L. (2018). Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. *Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.12.012>
- D'Souza-Schorey Crislyn, C., & Clancy, J. W. (2012). Tumor-derived microvesicles: Shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.192351.112>
- Dargan, D. J., & Subak-Sharpe, J. H. (1997). The effect of herpes simplex virus type 1 L-particles on virus entry, replication, and the infectivity of naked herpesvirus DNA. *Virology*. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8893>
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., ... Screaton, G. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1185181>
- Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2015). Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.005>
- Gallo, A., Vella, S., Miele, M., Timoneri, F., Di Bella, M., Bosi, S., ... Conaldi, P. G. (2017). Global profiling of viral and cellular non-coding RNAs in Epstein–Barr virus-induced lymphoblastoid cell lines and released exosome cargos. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.003>
- Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., & Mathivanan, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction:

Are they protective or pathogenic? *Proteomics*.

<https://doi.org/10.1002/pmic.201400234>

Gould, S. J., & Raposo, G. (2013). As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*.

<https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>

Guo, H., Chitiprolu, M., Roncevic, L., Javalet, C., Hemming, F. J., Trung, M. T., ...

Gibbins, D. (2017). Atg5 Disassociates the V1V0-ATPase to Promote Exosome Production and Tumor Metastasis Independent of Canonical Macroautophagy. *Developmental Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.018>

Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., ...

Mohanty, S. (2018). An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*.

<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0923-0>

Guzman, M. G., Alvarez, M., & Halstead, S. B. (2013). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3>

Halstead, S. B., Simmons, C. P., Farrar, J. J., Nguyen, van V. C., & Wills, B.

(2007). Dengue. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61687-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61687-0)

Harding, C. V., Heuser, J. E., & Stahl, P. D. (2013). Exosomes: Looking back three decades and into the future. *Journal of Cell Biology*.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201212113>

- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Hidari, K. I. P. J., & Suzuki, T. (2011). Dengue virus receptor. *Tropical Medicine and Health*. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S03>
- Hong, C. S., Muller, L., Whiteside, T. L., & Boyiadzis, M. (2014). Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00160>
- Hosseini, H. M., Fooladi, A. A. I., Nourani, M. R., & Ghanezadeh, F. (2013). The Role of exosomes in infectious diseases. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/1871528111312010005>
- Idrees, S., & Ashfaq, U. A. (2012). A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genetic Vaccines and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-10-6>
- Jan, A. T., Malik, M. A., Rahman, S., Yeo, H. R., Lee, E. J., Abdullah, T. S., & Choi, I. (2017). Perspective insights of exosomes in neurodegenerative diseases: A critical appraisal. *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00317>
- Jansen, F. H., Krijgsveld, J., Van Rijswijk, A., Van Den Bemd, G. J., Van Den Berg, M. S., Van Weerden, W. M., ... Jenster, G. (2009). Exosomal secretion of cytoplasmic prostate cancer xenograft-derived proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800443-MCP200>

- Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., ...
Mathivanan, S. (2012). Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biology*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>
- Khushman, M., Bhardwaj, A., Patel, G. K., Laurini, J. A., Roveda, K., Tan, M. C., ...
Singh, A. P. (2017). Exosomal markers (CD63 and CD9) expression pattern using immunohistochemistry in resected malignant and nonmalignant pancreatic specimens. *Pancreas*.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000847>
- Lässer, C., Seyed Alikhani, V., Ekström, K., Eldh, M., Torregrosa Paredes, P., Bossios, A., ... Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>
- Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., & Vlassov, A. V. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0502>
- Liao, Y., Du, X., Li, J., & Lönnerdal, B. (2017). Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Molecular Nutrition and Food Research*.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201700082>
- Ludwig, N., Whiteside, T. L., & Reichert, T. E. (2019). Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20194684>

- Martins, S. de T., Kuczera, D., Lötvall, J., Bordignon, J., & Alves, L. R. (2018). Characterization of dendritic cell-derived extracellular vesicles during dengue virus infection. *Frontiers in Microbiology*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01792>
- Mazurov, D., Barbashova, L., & Filatov, A. (2013). Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.12110>
- McKelvey, K. J., Powell, K. L., Ashton, A. W., Morris, J. M., & McCracken, S. A. (2015). Exosomes: Mechanisms of Uptake. *Journal of Circulating Biomarkers*.
<https://doi.org/10.5772/61186>
- Mori, Y., Koike, M., Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H., ... Yamanishi, K. (2008). Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic*.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00796.x>
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>
- Pleet, M. L., DeMarino, C., Lepene, B., Aman, M. J., & Kashanchi, F. (2017). The Role of Exosomal VP40 in Ebola Virus Disease. *DNA and Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1089/dna.2017.3639>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>

- Reyes-del Valle, J., Salas-Benito, J., Soto-Acosta, R., & del Angel, R. M. (2014). Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. *Current Tropical Medicine Reports*. <https://doi.org/10.1007/s40475-013-0002-7>
- Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., De Jesús-González, L. A., Hurtado-Monzón, A. M., Farfan-Morales, C. N., Cervantes-Salazar, M., ... del Angel, R. M. (2019). Isolation and characterization of exosomes released from mosquito cells infected with dengue virus. *Virus Research*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.015>
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Sierra, B., Perez, A. B., Vogt, K., Garcia, G., Schmolke, K., Aguirre, E., ... Guzman, M. G. (2010). Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? *Cellular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.02.005>
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., & Xiao, Z. (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.22733>

- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., ...
Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*.
<https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>
- Verweij, F. J., Van Eijndhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Vendrig, T., Wurdinger, T., Cahir-Mcfarland, E., ... Pegtel, D. M. (2011). LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.123>
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014). Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.009>
- Zhang, W., Jiang, X., Bao, J., Wang, Y., Liu, H., & Tang, L. (2018). Exosomes in pathogen infections: A bridge to deliver molecules and link functions. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00090>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*.
<https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhao, B. T., Prince, G., Horswood, R., Eckels, K., Summers, P., Chanock, R., & Lai, C. J. (1987). Expression of dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS1 by a recombinant vaccinia virus. *Journal of Virology*.
- Zhou, W., Woodson, M., Neupane, B., Bai, F., Sherman, M. B., Choi, K. H., ...
Sultana, H. (2018). Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus

transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells. *PLoS Pathogens*.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006764>

Zhou, W., Woodson, M., Sherman, M. B., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2019).

Exosomes mediate Zika virus transmission through SMPD3 neutral Sphingomyelinase in cortical neurons. *Emerging Microbes and Infections*.

<https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1578188>