

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXOSOMAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS
U-937 INFECTADOS CON EL DENV-2”.**

ARTURO GABRIEL BALBÁS TEPEDINO.

**Trabajo de grado para obtener el título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Grupo de Virología – Universidad El Bosque
Facultad de Ciencias
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Bogotá-Colombia
2018**

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXOSOMAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS
U-937 INFECTADOS CON EL DENV-2”.**

ARTURO GABRIEL BALBÁS TEPEDINO.

Trabajo de grado para obtener el título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

MYRIAM LUCÍA VELANDIA ROMERO

Directora.

Lic. Biología, MSc Ciencias Biológicas, PhD Ciencias Químicas

JAIME EDUARDO CASTELLANOS PARRA

Co-director.

OD, MSc Ciencias Farmacológicas, PhD Ciencias Químicas

Grupo de Virología – Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bogotá-Colombia

2017

NOTA DE SALVEDAD

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

RESUMEN

Los exosomas son vesículas secretadas por diferentes tipos celulares y contienen en su interior moléculas bioactivas que pueden modificar el comportamiento de la célula receptora. Hay evidencia que muestra que varios virus utilizan estas vesículas para transportar factores como proteínas, RNA y miRNA que favorecen el establecimiento de una infección productiva y/o modulan la respuesta celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de exosomas de macrófagos U-937 infectados con el DENV-2 y caracterizar su contenido. Macrófagos adherentes U-937 se infectaron con el virus dengue serotipo 2 (DENV-2) a una MOI de 0,2 y se mantuvieron en el medio definido BIO-MPM-1 durante 96-120 horas, como control negativo se mantuvieron con el mismo medio células no infectadas. Al finalizar el tiempo post-infección se recolectaron los sobrenadantes y las vesículas se aislaron por ultrafiltración y ultracentrifugación y se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), SDS-PAGE, Western Blot y espectrometría de masas. También, se cuantificó la concentración de proteína y la actividad de acetilcolinesterasa, se determinó la densidad en gradientes de sacarosa, y se extrajeron los RNAs pequeños (sRNAs). Adicionalmente, se determinó la capacidad infecciosa de los exosomas mediante el análisis de focos infecciosos utilizando exosomas purificados por inmunoprecipitación e inoculados en células LLC-MK2. A las 120 hpi el porcentaje de infección fue 75% con una viabilidad celular del 80%. De acuerdo a la cuantificación de proteínas y a la actividad de AChT la infección con DENV-2 no afectó la producción ni secreción de los exosomas, Por TEM se detectaron vesículas esféricas en forma de copa de aproximadamente 100 nm, con una densidad de flotación entre 1,14 y 1,19 g/mL, estas vesículas fueron positivas para las proteínas del complejo ESCRT ALIX y TSG-101, la tetraspanina CD63 y la histona 3 (H3). Interesantemente los exosomas fueron positivos para la proteína viral NS3, la cual coincidió con ALIX en exosomas con densidades entre 1,20 y 1,25 g/mL. Finalmente, de acuerdo al ensayo de focos, los exosomas secretados por las células infectadas no transportan partículas virales ni RNA infeccioso, sin embargo, estas vesículas están enriquecidas con sRNA. El protocolo utilizado en este trabajo permitió obtener exosomas con alto grado de pureza con características físicas similares a las reportadas para estas vesículas en otros modelos celulares. La presencia de NS3 y de los sRNA en los exosomas secretados por los macrófagos infectados, podrían ser una estrategia para iniciar o modular la respuesta inmune en diferentes tipos celulares infectadas o no infectadas. **Palabras clave:** DENV-2, macrófagos U-937 y exosomas.

ABSTRACT

Exosomes are vesicles secreted by different cell types and contain in their interior bioactive molecules that can modify the behavior of the receptor cell. There is evidence that several viruses use these vesicles to transport factors such as proteins, RNA and miRNA that favor the establishment of a productive infection and/or modulate the cellular response. The objective of this work was to evaluate the production of exosomes of U-937 macrophages infected with DENV-2 and to characterize its content. Adherent macrophages U-937 were infected with the dengue virus serotype 2 (DENV-2) at an MOI of 0.2 and were maintained in the defined medium BIO-MPM-1 for 120 hours. At the end of the post-infection time, the supernatants were collected and the vesicles were isolated by ultrafiltration and ultracentrifugation and characterized by transmission electron microscopy (TEM), SDS-PAGE, Western Blot and mass spectrometry. Also, protein concentration and acetylcholinesterase activity were quantified, density was determined in sucrose gradients, and small RNAs (sRNAs) were extracted. Additionally, the infectious capacity of the exosomes was determined by the analysis of infectious foci using exosomes purified by immunoprecipitation and inoculated in LLC-MK2 cells. At 120 hpi the percentage of infection was 75% with a cell viability of 80%. According to protein quantification and AChT activity, infection with DENV-2 did not affect the production or secretion of the exosomes. By TEM, cup-shaped spherical vesicles of approximately 100 nm were detected, with a density of flotation between 1,14 and 1,19 g/mL, these vesicles were positive for the ESCRT ALIX and TSG-101 complex proteins, tetraspanin CD63 and histone 3 (H3). Interestingly, the exosomes were positive for the NS3 viral protein, which coincides with ALIX in exosomes with densities between 1,20 and 1,25 g/mL. Finally, according to the foci assay, the exosomes secreted by the infected cells do not carry viral particles or infectious RNA, however, these vesicles are enriched with sRNA. The protocol used in this study allowed obtaining exosomes with a high degree of purity with physical characteristics similar to those reported for these vesicles in other cellular models. The presence of NS3 and sRNA in exosomes secreted by infected macrophages could be a strategy to initiate or modulate the immune response in different infected or uninfected cell types. **Key words:** DENV-2, U-937 macrophages and exosomes.

Dedicatoria

A Oma y a Juan Leonardo, mis grandes amores.

A mis Padres y a mis Suegros, por su apoyo incondicional.

A mi Venezuela bonita, por forjarme académicamente y como persona.

A Joaquín, Jhonny, Camucha, Tavira, Armando, Biby, Oscar, Marlon, GCG y RML.

Agradecimientos

A Dios Todopoderoso.

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad el Bosque.

Al Doctor Jaime por su confianza y apoyo constante.

A la Doctora Myriam por ser mi guía y amiga durante todo este proceso.

Al Doctor Alfonso Barreto por su apoyo desinteresado.

A la Familia del grupo de Virología: Carolina, Sigrid, María Angélica, Edgar, Lilia, Sonia Shirley, Karina, Hernando, Paula, Doctor Giovanni, Doctora Eliana, Sandra, Isabel y Doctora Nadia.

Al grupo de Biología Molecular: Doctora Jaqueline, Doctora Paula y Liliana.

Al grupo UIBO-MO: Diana y Yormaris.

Al grupo UIBO-BIOT: Doctora Marcela Buitrago.

Al personal de lavado de material: Helena, Nancy y Lucy.

Al personal de mantenimiento del laboratorio: Mery y Flor.

LISTA DE FIGURAS.

Figura	Nombre	Página
1	Biogénesis de los exosomas	16
2	Interacción de los exosomas con la célula receptora	18
3	Diseño experimental	26
4	Porcentaje de infección y viabilidad celular de macrófagos U-937 infectados con el DENV-2	31
5	Evaluación de la secreción de las vesículas mediante SDS-PAGE, concentración de proteínas y actividad de AChE	33
6	Caracterización de las vesículas por WB y TEM	34
7	Gradiente de densidad de sacarosa	35
8	Identificación por WB de las proteínas virales NS3 y NS5 en exosomas secretados por células infectadas	37
9	Inmunoprecipitación (IP) de los exosomas con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD63	38
10	Evaluación de la capacidad de infección de los exosomas producidos por las células U-937 infectadas con el DENV-2	39
11	Presencia de RNA pequeños (sRNA) en exosomas obtenidos de células U-937 infectadas y no infectadas	40

LISTA DE TABLAS.

Tabla	Nombre	Página
1	Listado de proteínas identificadas por nano MS/MS LC de las vesículas producidas por células infectadas y no infectadas.	35

TABLA DE CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 Los exosomas.....	14
2.2 Biogénesis de los exosomas.....	15
2.3 Los exosomas como mediadores de la comunicación intercelular.....	17
2.4 Respuesta inmune.....	18
2.5 Cáncer.....	19
2.6 Enfermedades neurodegenerativas.....	19
2.7 Infecciones virales.....	19
2.8 El DENV	21
3. Objetivos.....	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGÍA.....	24
4.1 Cultivos celulares e infección con DENV-2.....	24
4.2 Determinación de la viabilidad celular.....	24
4.3 Determinación del porcentaje de infección por inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	24
4.4 Aislamiento de los exosomas.....	25
4.5 Caracterización de los exosomas.....	25
4.5.1 Cuantificación de proteínas por BCA.....	25
4.5.2 Determinación de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE).....	26
4.5.3 Flotación de vesículas en gradiente de sacarosa.....	27
4.5.4 SDS-PAGE, y Western Blot.....	27
4.5.5 Análisis de proteínas por cromatografía líquida a nano-escala acoplada a espectrometría de masas en tándem (nano LC-MS/MS).....	28
4.5.6 Microscopia electrónica de transmisión TEM.....	28
4.5.7 Evaluación de RNA pequeños (sRNA) en vesículas purificadas de macrófagos U-937 infectados y no infectados.....	28
4.6 Evaluación de la infectividad de las vesículas secretadas por macrófagos U-937 infectados.....	29
4.6.1 Inmunoprecipitación (IP) de las vesículas enriquecidas de exosomas utilizando perlas acopladas anti CD63.....	29

4.6.2 Análisis de focos infecciosos.....	29
5. RESULTADOS	31
5.1 Las células U-937 se mantuvieron viables luego de 120 horas post-infección.....	31
5.2 El protocolo estandarizado permitió obtener vesículas, con una concentración de proteínas y la actividad de la AChE similar respecto al control.....	32
5.3 Las células U937 infectadas y no infectadas produjeron subpoblaciones de vesículas constituidas por proteínas del complejo ESCRT, la tetraspanina CD63 e H3.	33
5.4 Las vesículas de las células U937 infectadas transportan la proteína NS3 del virus.	36
5.5 Las vesículas secretadas por macrófagos U937 infectados transportan micro RNA (miRNA) pero no partículas virales o RNA infeccioso.....	37
6. DISCUSIÓN.....	41
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	44
8. BIBLIOGRAFÍA.....	45
9. ANEXOS.....	51
9.1 Figuras complementarias.	51
9.1.1 Figura complementaria 1.	51

1. INTRODUCCIÓN

Los exosomas son vesículas de membrana secretadas por diferentes tipos de células y se encuentran en grandes cantidades en fluidos corporales como orina, sangre, leche materna y saliva. Estas vesículas están constituidas por una bicapa de fosfolípidos y en su interior contienen proteínas y RNAs que pueden modificar el comportamiento de la célula receptora. Los exosomas son importantes en la comunicación intercelular puesto que median diferentes vías de señalización y en consecuencia están relacionados con diferentes condiciones fisiológicas y patológicas como: coagulación, angiogénesis, diferenciación celular, respuesta inmune, cáncer e infecciones virales. En estudios de infección con diferentes virus, incluidos virus de la familia Flaviviridae -a la que pertenece el DENV-, han demostrado que estos utilizan a los exosomas para transportar elementos regulatorios virales y/o celulares desde células infectadas hasta células no infectadas para modular la respuesta celular a favor de la infección.

Por lo tanto este trabajo evaluó la secreción de vesículas por macrófagos humanos U-937 infectados por DENV-2, aislados por ultra-filtración y ultra-centrifugación y se caracterizaron mediante la identificación de proteínas celulares y virales a través de Western Blot y espectrometría de masas, además se establecieron las características biofísicas de estas vesículas mediante microscopía electrónica de transmisión y gradiente de densidad de sacarosa. También se determinó la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) para evaluar de manera indirecta si la infección por el virus, indujo cambios en la secreción de las vesículas. También se evaluó la infectividad de las vesículas aisladas mediante el análisis de focos infecciosos, inoculando en células LLC-MK2 las vesículas purificadas por inmunoprecipitación. Finalmente extrajo el RNAs y se determinó la concentración y el tamaño de los RNA presentes en estas vesículas.

Las vesículas extracelulares (ECVs) secretadas por macrófagos U-937 fueron positivas para las proteínas celulares ALIX, TSG101 y CD63 además presentaron la densidad y la morfología que coinciden con exosomas en otros modelos celulares. De acuerdo al gradiente de intensidad se identificaron dos subpoblaciones de exosomas, unos menos densos, ricos en ALIX y CD63, y otros de mayor densidad que contuvieron principalmente H3, lo que sugiere la presencia de otro tipo de vesículas como los cuerpos apoptóticos. Interesantemente la proteína NS3 se identificó en el pellet crudo obtenido del sobrenadante de células infectadas y coincidió con ALIX y H3 en el gradiente de densidad. Mediante el estudio de focos infecciosos se determinó que las ECVs secretadas por células infectadas no transportaron partículas virales ni RNA infeccioso, sin embargo, estas vesículas presentaron un alto contenido de miRNAs.

En conjunto estos resultados indicaron que las ECVs secretadas por macrófagos U-937 infectados por el DENV-2 pueden tener un rol preponderante durante la patogénesis de la enfermedad, ya que contienen elementos bioactivos como la proteína NS3 y miRNAs que pueden modular la respuesta celular a favor o en contra de la infección.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Los exosomas.

Todas las células eucariotas secretan vesículas extracelulares (ECVs) que ejercen funciones pleiotrópicas en la comunicación intercelular (1). Las EVs son partículas esféricas rodeadas por una bicapa de proteolípidos y en su interior contienen moléculas bioactivas como RNAs, DNAs, proteínas y lípidos (1-2). Las EVs controlan directa o indirectamente un amplio rango de funciones biológicas mediante la transferencia de proteínas de membrana, moléculas de señalización, mRNA y miRNA que pueden modificar el comportamiento de la célula receptora (1). La interacción de las ECVs con otras células regula varias condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo, enfermedades infecciosas, cáncer y desordenes neurodegenerativos (1-2). Las ECVs pueden ser clasificadas de acuerdo a su biogénesis, tamaño, origen celular, composición proteica, contenido de mRNA y miRNA y/o función biológica. Utilizando la biogénesis como mecanismo de clasificación las ECVs pueden dividirse en tres grupos: exosomas, microvesículas (MVs) y cuerpos apoptóticos (ABs) (3). Los exosomas son vesículas de membrana de origen endocítico, secretadas por diferentes tipos de células en cultivo y se encuentran en grandes cantidades en fluidos corporales incluyendo sangre saliva, orina y leche materna (4), tienen un diámetro entre 30 y 100 nm y una densidad de flotación entre 1.13 y 1.19 g/ml, su morfología ha sido descrita como en forma de copa después de la fijación, adhesión, coloración negativa y visualización por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En cuanto a su composición bioquímica, los exosomas están rodeados por una membrana de fosfolípidos que contiene altos niveles de colesterol, esfingomielina y ceramida además de dominios de membrana resistentes a detergentes (balsas lipídicas) (2,5). Estas vesículas están constituidas por proteínas de transporte y fusión de membranas (GTPasas, flotilina, anexinas), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), proteínas de shock térmico (Hsc 70, Hsp 90), proteínas que están involucradas en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares (ALIX, Tsg 101), proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina), proteínas involucradas en la transducción de señales (quinasas 14-3-3 y proteínas G heterotrimérica), enzimas (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, acetilcolinesterasa, factores de elongación) (6-7) . Su composición refleja su origen endosomal y le permite viajar de una célula a otra fusionándose con la membrana plasmática de la célula blanco descargando su contenido fácilmente. Uno de los aspectos más interesantes de los exosomas como mediadores de comunicación intercelular es el empaquetamiento de RNAs (mRNA, miRNA) derivados de la célula secretora que pueden motivar una rápida alteración en la expresión genética de una célula vecina. El mensaje entregado por este tipo de comunicación intercelular puede incluir crecimiento, diferenciación, supervivencia, división, respuesta a stress, apoptosis, etc. (8). Las MVs tienen un tamaño que va de 100 a 1000 nm y se forman a partir de la gemación de la membrana

plasmática hacia el exterior, de esta manera las MVs son liberadas directamente al espacio extracelular. CD40, el factor 6 de ribosilación de adenosina difosfato, fosfatidilserina y una gran variedad de selectinas e integrinas han sido propuestos como marcadores de MVs. Al igual que los exosomas, su contenido también incluye proteínas citosólicas, mRNA y miRNA (3). Cuando las células están en la fase tardía de la apoptosis liberan vesículas frecuentemente llamadas vesículas apoptóticas o cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos tienen un tamaño que va desde 500 a 4000 nm y a diferencia de los otros dos tipos de vesículas, los cuerpos apoptóticos contienen organelas, fragmentos de DNA e histonas como parte de su contenido, además de proteínas y otras moléculas de la célula parental. Para su identificación la trombospondina y el componente del complemento C3b son aceptados como marcadores clásicos de cuerpos apoptóticos (3).

2.2 Biogénesis de los exosomas.

Durante la endocitosis, las células incorporan nutrientes, fragmentos de membranas, receptores de la superficie celular y diversos tipos de moléculas a través de compartimientos morfológica y bioquímicamente distintos caracterizados como endosoma “temprano” o “tardío” dependiendo de la cinética con que estos compartimientos son cargados de material endocitado (9-10). Los cuerpos multivesiculares (MVBs) son un subconjunto de endosomas tardíos que contienen vesículas internas denominadas ILVs. Las ILVs tienen un diámetro de aproximadamente 30 a 100 nm y se forman a partir de la invaginación de la membrana limitante endosomal hacia su lumen (8).

Los MVBs pueden seguir dos rutas: la degradativa y la exocítica. En la ruta degradativa un conjunto de proteínas que se encuentran en la membrana limitante de los MVBs son reclutadas selectivamente e incorporadas dentro de las ILVs, posteriormente los MVBs se fusionan con los lisosomas donde las ILVs son degradadas por enzimas hidrolíticas presentes en el lumen de esta organela, mientras que las proteínas que se encuentran en la membrana limitante de los MVBs se fusionan a la membrana limitante de los lisosomas. En la ruta exocítica los MVBs se fusionan con la membrana plasmática para liberar las ILVs al espacio extracelular las cuales pasan a denominarse exosomas (12-13). Cuando los exosomas son secretados, pueden seguir una de estas tres vías: ser capturados por células vecinas o por la misma célula que le dio origen, ser internalizados por células que se encuentran a cierta distancia o alternativamente pueden entrar a la circulación sistémica y ser tomados por células de diferentes tejidos (14).

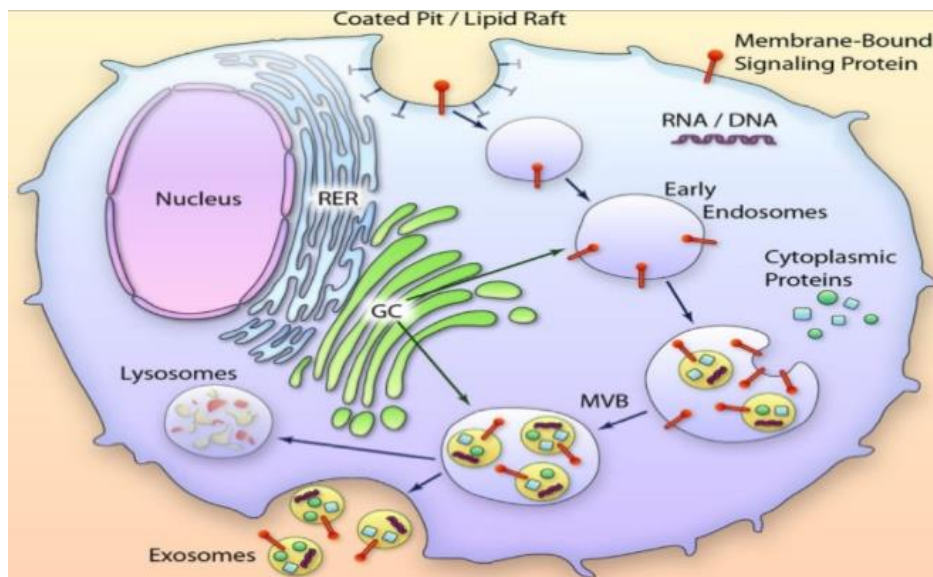


Figura 1. Biogénesis de los exosomas. Los exosomas se producen en el endosoma tardío y contienen proteínas provenientes del aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y proteínas recicladas desde la membrana plasmática, estas vesículas también empaquetan ácidos nucleicos y proteínas presentes en el citoplasma de la célula secretora. La gemación de la membrana limitante del MVB hacia su lumen asegura que las proteínas unidas a la membrana limitante de los exosomas conserven la misma orientación y plegamiento que las proteínas ancladas en la membrana plasmática. Los MVBs se funden con la membrana plasmática para liberar a los exosomas o pueden ser dirigidos hasta los lisosomas para su degradación (11).

La movilización de MVBs secretorios a la periferia celular, su acoplamiento y fusión con la superficie celular requiere de proteínas del citoesqueleto (actina y microtúbulos), motores moleculares (kinesinas y miosinas), interruptores moleculares (pequeñas GTPasas) y la maquinaria de fusión (SNAREs) (15-16). Varios estudios han proporcionado evidencia bioquímica y morfológica que éstas dos rutas, se basan en dos poblaciones diferentes de MVBs que coexisten dentro de la misma célula (2,15).

La formación de las ILVs está coordinada por el complejo de clasificación endosomal (ESCRT). Este complejo consiste en cuatro grupos multiproteínicos solubles denominados ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III asociados a proteínas accesorias como ALIX y VPS4. ESCRT - 0, -I y -II reconocen y secuestran proteínas ubiquitinadas presentes en la membrana limitante de los MVBs e inician la oligomerización y formación de ESCRT-III, el cual es responsable de la invaginación de la membrana y la posterior escisión de la ILVs (2,15). Mientras que el ESCRT es requerido para marcar la trayectoria de proteínas de membrana que van a ser degradadas en los lisosomas, la función de la maquinaria ESCRT en la formación de ILVs que van a ser secretadas como exosomas aún no está clara pese a que análisis proteómicos de exosomas han identificado proteínas del complejo ESCRT como ALIX y TSG 101 (17). En células dendríticas la biogénesis de exosomas depende del complejo ESCRT

(18), mientras que en líneas celulares oligodendrogliales la biogénesis y secreción de exosomas no requiere del ESCRT, sin embargo es dependiente de la enzima esfingomielinasa, una enzima que produce ceramida, esto es consistente con la alta concentración de ceramida presente en los exosomas derivados de estas células (19). Las tetraspaninas CD9, CD63 y CD82 que también están en altas concentraciones en los MVBs igualmente han sido involucradas en la formación de los MVBs y exosomas. La existencia de mecanismos alternos para la formación de MVBs es soportada por resultados obtenidos en células depletadas de las cuatro subunidades del complejo ESCRT, las cuales son capaces de secretar vesículas positivas para CD63, un marcador clásico de exosomas, evidenciando que en células mamíferas pueden operar varios mecanismos independientes de la maquinaria ESCRT (2,6).

2.3 Los exosomas como mediadores de la comunicación intercelular.

Inicialmente se creía que los exosomas formaban parte de un mecanismo para eliminar desechos en células con poca capacidad de degradación lisosomal, posteriormente se hizo evidente la importancia de estas vesículas en diversos procesos fisiológicos. Los exosomas son importantes en la comunicación intercelular puesto que median diferentes vías de señalización, esta función es ejecutada por mecanismos diferentes, entre ellos: (i) proteínas que están ancladas en la membrana de los exosomas interactúan con sus receptores presentes en la membrana plasmática de la célula blanco, activándose la señalización intracelular, (ii) proteasas 9 extracelulares clivan proteínas presentes en la membrana exosomal, liberando ligandos solubles que se unen a receptores específicos localizados en la superficie celular, (iii) fusión de los exosomas con la membrana celular de la célula receptora, descargando Contenido en el citoplasma, (iii) internalización de los exosomas a través de mecanismos endocíticos (fagocitosis, macropinocitosis o endocitosis mediada por receptor) (17).

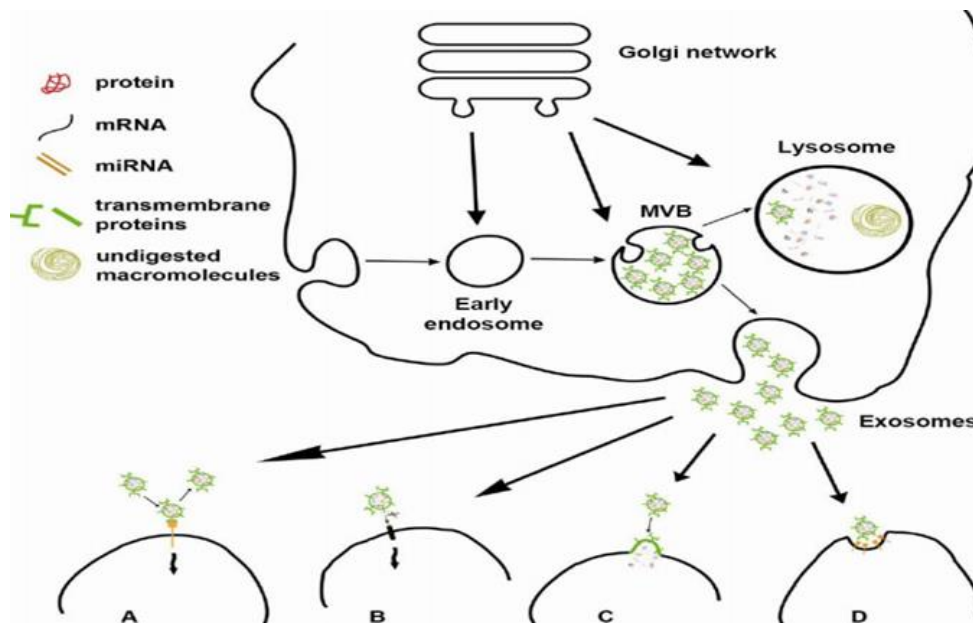


Figura 2. Interacción de los exosomas con la célula receptora: A) Los exosomas activan la señalización por la interacción ligando-receptor, sin internalización. B) proteasas extracelulares clivan proteínas presentes en la membrana exosomal liberando factores solubles que se unen a receptores específicos en la superficie celular. C) los exosomas se fusiona con la membrana plasmática liberando su contenido en el citoplasma. D) las células receptoras internalizan a los exosomas por mecanismos endocíticos (fagocitosis, macropinocitosis o endocitosis mediada por receptor) (17).

De acuerdo a su origen celular los exosomas pueden estar relacionados con múltiples funciones, por ejemplo:

2.4 Respuesta inmune.

Los exosomas son considerados facilitadores de la respuesta inmune, ya que pueden transportar el antígeno nativo, también pueden transportar péptidos antigénicos acoplados al MHC (17,20). Al respecto, estudios relacionados con la activación de las células T mediante exosomas, han demostrado estos complejos (MHC-péptido) transportados por exosomas, pueden unirse directamente a su receptor específico o alternativamente estos exosomas pueden ser internalizados y procesados por células presentadoras de antígenos (APC), para que estas posteriormente activen a las células T. Sin embargo, otros estudios resaltan el efecto inmunosupresor de los exosomas, el cual consiste en disminuir la proliferación de linfocitos T y de células asesinas naturales (NK) o promover la diferenciación de células inmunosupresoras como las células T reguladoras (17). Además de mediar la respuesta inmune a través de moléculas presentes en su superficie, los exosomas transportan mediadores solubles como la interleucina 1 β (IL1 β), IL6, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento transformante (TGF), quimioquina ligando 2 (CCL2), CCL3, CCL5 y CCL20 (21).

2.5 Cáncer.

La interacción directa entre las células tumorales y su entorno es esencial para la progresión del cáncer. Los exosomas son de suma importancia para instaurar un microambiente pro-tumoral para la carcinogénesis, regulando la respuesta inmune y de esta manera favorecer la progresión tumoral y la supervivencia. Para llevar a cabo estas tareas los exosomas participan en la remodelación de la matriz extracelular, angiogénesis, trombosis y proliferación de células tumorales. Debido a su estabilidad y su capacidad de transferir proteínas, miRNA y/o mRNA los exosomas pueden viajar a tejidos distantes, fomentar un ambiente favorable a tumores y proveer un nicho metastásico (14).

2.6 Enfermedades neurodegenerativas.

Aparte de participar en el desarrollo y en la fisiología del sistema nervioso central, los exosomas están asociados a la generación y progresión de enfermedades neurodegenerativas mediante el transporte de proteínas mal plegadas. En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, la proteína α -sinucleína mutada, forma oligómeros intracelulares (llamados cuerpos de Lewys) que son secretados al medio extracelular vía exosomas e internalizados por células vecinas. Los exosomas también están relacionados con el transporte de inclusiones filamentosas intracelulares, formadas por agregados de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer y en la propagación de PrPSc (agente infeccioso asociado a enfermedades priónicas como la enfermedad de Creutzfeldt–Jakob y el síndrome de Gerstmann–Sträussler–Scheinker) (14).

2.7 Infecciones virales.

La naturaleza evolutiva de los virus les permite diseñar y modificar estrategias para sortear la respuesta inmune y secuestrar la maquinaria celular del hospedero para usarla en beneficio de su supervivencia y propagación. Los mecanismos celulares para la biogénesis y secreción de los exosomas son utilizados por los virus para evadir la vigilancia inmune y transportar factores regulatorios como proteínas, RNA viral, miRNA viral y celular junto otros elementos funcionales genéticos desde una célula infectada hasta células vecinas, ayudando a establecer una infección productiva, modulando la respuesta celular y amplificando o limitando la infección, esto último depende del tipo de patógeno y célula blanco (22-23). El HIV utiliza la vía endocítica para coordinar su ensamble y liberación, secuestrando la maquinaria que genera las membranas internas de los MVBs (24). Exosomas derivados de células infectadas con HIV pueden transportar factores de virulencia como la proteína NEF importante en la replicación, supervivencia e infección y responsable de la inmunodisfunción de los linfocitos T CD4⁺ (25-27). La

captura del HIV por células dendríticas inmaduras y linfocitos T CD4⁺ induce a la producción de partículas virales que exponen proteínas exosomales características como CD63 y CD9, la presencia de estas proteínas ayuda al virus a escapar de su reconocimiento por el sistema inmune, este camuflaje es mejorado con glicoproteínas derivadas de la célula huésped, haciendo al virus muy semejante a vesículas de membrana propias de estas células (5).

Células infectadas por el virus Epstein Barr (EBV) liberan exosomas que exponen a la proteína viral LMP-1 la cual inhibe la proliferación de células mononucleares, esto podría ser relevante en tumores asociados a EBV tales como el carcinoma nasofaríngeo y la enfermedad de Hodgkin, porque les permite a las células tumorales escapar de la vigilancia inmune (28). Durante la infección por HSV-1 las células liberan vesículas de membrana formalmente llamadas partículas L que contienen proteínas del tegumento viral que pueden actuar como factores de transcripción tempranos produciendo una rápida activación transcripcional en células no infectadas preparándolas para una eventual llegada de viriones intactos y de esta manera alcanzar una infección productiva y reducir el rechazo inmune. Células infectadas por CMV secretan exosomas que contienen glicoproteína B de CMV en complejo con lectinas tipo C, esta última es expresada en células dendríticas para la captura e internalización de patógenos, este complejo promueve la captura de partículas virales infecciosas incrementando la susceptibilidad al virus en células vecinas (29). Células infectadas por el HTLV-1 liberan exosomas que contienen mediadores proinflamatorios y la proteína viral Tax, la cual controla varias vías celulares críticas como los mecanismos de respuesta al daño de DNA celular, progresión del ciclo celular y apoptosis, además de transcritos de mRNA viral de las proteínas Tax, HBZ y Env. La adición de exosomas provenientes de células infectadas con HTLV-1 a células dendríticas resulta en un incremento de IL-2, IL-5 y IL-6 y citoquinas, esto sugiere que los exosomas tienen un rol importante en la transducción de la señal y pueden contribuir con la patogénesis de la infección por HTLV-1 (22). En el caso del rotavirus *Barreto et al*, determinaron que vesículas secretadas por células CACO-2 infectadas con este virus transportan factores inmunomoduladores como TGF β 1, que inducen muerte celular e inhiben la proliferación de linfocitos T CD4⁺, además demostraron mediante inmuprecipitación la asociación entre la proteína viral VP6 y vesículas positivas para CD63 (30).

Finalmente, el HCV exporta RNA viral y viriones desde hepatocitos infectados mediante exosomas, aprovechando la capacidad fusogénica de estas vesículas infectando a otras células por un mecanismo independiente de las proteínas de envoltura, contribuyendo a la infección natural por HCV, incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes (31-34). Estos exosomas también pueden mediar la transferencia de RNA inmunoestimuladorio desde células infectadas a células dendríticas induciendo una respuesta inmune innata contra el HCV, de esta manera la exportación de RNA viral a través de

exosomas puede servir como estrategia viral para evadir la respuesta inmune y como estrategia de la célula huésped para inducir una respuesta inmune innata (31).

2.8 El DENV

El dengue es una enfermedad infecciosa, de carácter endemo-epidémico, transmitida por la picadura de mosquitos hembras del género *Aedes* infectados con el DENV. Actualmente es la arbovirosis de mayor relevancia a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad y afectación económica (35-36). El DENV es endémico en más de 100 países incluyendo el Sureste de Asia, América, África, el Pacífico Occidental y el Medio Oriente. Estimaciones hechas en el año 2013 sumaron más de 390 millones de personas infectadas con el DENV, tres veces más de lo que OMS estimó en el año 2012 (37). El DENV es un virus envuelto que posee una cadena sencilla de RNA de sentido positivo, pertenece al género flavivirus de la familia Flaviviridae (37-38). El DENV incluye 4 serotipos (DENV 1-4) y muchos genotipos de acuerdo a la secuencia del gen E (38). El DENV entra a las células por endocitosis mediada por clatrina, la vesícula endocítica portadora del virión se transforma en endosoma temprano y posteriormente en endosoma tardío viajando hasta la región perinuclear en donde la proteína de envoltura E sufre cambios conformacionales en su estructura debido al bajo pH del lumen del compartimento endocítico, favoreciendo la expresión y anclaje del péptido de fusión de esta proteína a la membrana del endosoma, permitiendo la fusión de la envoltura viral con la membrana limitante del endosoma y posterior liberación de la nucleocapside al citoplasma donde ocurre la replicación y traducción del RNA viral, dando origen a una poliproteína que es clivada cotraduccionalmente por proteasas virales y celulares generando tres proteínas estructurales C, PrM y E y siete no estructurales NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 (39,41). La replicación del DENV ocurre en estrecha asociación con estructuras membranosas citoplasmáticas inducidas por el virus que envuelven a la maquinaria de amplificación de RNA, el ensamble de las proteínas virales PrM y E junto con el RNA viral ocurre en el lumen del retículo endoplásmico (ER), seguido por la liberación del nuevo virión mediante gemación desde el ER vía aparato de Golgi, en este proceso el virión adquiere la envoltura lipídica donde están insertadas las proteínas PrM y E. La maduración de la partícula viral ocurre en la red trans Golgi donde se lleva a cabo el clivaje de la proteína PrM por la proteasa furina, finalmente la partícula viral madura es liberada al espacio extracelular a través de la vía secretoria mediante exocitosis (42-43).

La infección por DENV se clasifica en dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave, caracterizadas estas dos últimas por anomalías en la hemostasia e incremento en la permeabilidad vascular (37). A pesar de los numerosos estudios realizados a la infección por DENV aún

no se comprenden muy bien los mecanismos inmunopatogénicos que tienen lugar y que conllevan a una buena parte del daño endotelial observado en la enfermedad (44).

Hasta ahora se conoce poco acerca de la participación de los exosomas durante la infección por el DENV, no obstante, *Zhu et al* (45) reportaron que exosomas secretados por diferentes tipos de células infectadas por el DENV-2, entre ellas células HUVEC, BHK y macrófagos U-937, secretan exosomas que contienen a la proteína transmembranal inducida por interferón 3 (IFITM3) la cual induce un efecto antiviral en células HeLa no infectadas. Sin embargo, no hay evidencia aún que sugiera que el DENV utilice los exosomas como un mecanismo para amplificar la infección.

Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la secreción de exosomas por macrófagos U-937 infectados o no con el DENV-2, se determinó el perfil proteico de estas vesículas mediante Western Blot y espectrometría de masas, también se evaluó las características físicas de los exosomas mediante TEM y gradiente de densidad de sacarosa, se hizo extracción y análisis de calidad de sRNA. Finalmente se hizo un análisis de focos infecciosos para determinar la infectividad de los exosomas secretados por células infectadas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Evaluar la producción de exosomas en macrófagos humanos U937 infectados con el DENV-2.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar y cuantificar los exosomas producidos en cultivos de macrófagos humanos U937 durante la infección con el DENV-2.
- Evaluar la presencia de RNA viral y de las proteínas NS1 y/o E en los exosomas aislados de macrófagos humanos U937 infectados con el DENV-2.
- Determinar la capacidad infecciosa de los exosomas aislados de macrófagos humanos U937 infectados con el DENV-2.

4. METODOLOGÍA

4.1 Cultivos celulares e infección con DENV-2.

Se utilizó la línea celular U937 mantenida en DMEM (Lonza, Valais Switzerland), suplementada con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Thermo Fisher, Rockford IL USA) y 1% penicilina-estreptomicina (AB) (Thermo Fisher, Rockford IL, USA) 24 horas post-siembra se disociaron las células con tripsina-EDTA 1X (Lonza, Valais Switzerland).

Una vez adheridas, las células se infectaron por 1 hora a 37 °C con una cepa del DENV-2 (INS-2009, Aislado colombiano) a una MOI 0,2 resuspendido en DMEM suplementado con SFB al 1 % y AB al 1 %, en agitación constante (35 rpm). Como control negativo se mantuvieron células con medio. Posteriormente se retiró el inóculo y las células se lavaron con PBS y se mantuvieron entre 96 a 120 horas post-infección (hpi) en el medio definido BIO-MPM-1 (Biological Industries, Cromwell CT, USA), suplementado con glutamina 2 mM (Thermo Fisher, Rockford IL USA). Todos estos procedimientos se realizaron en condiciones apirogénicas. Para todos los experimentos descritos se procesaron los sobrenadantes de aproximadamente $5,5 \times 10^7$ células provenientes de 10 frascos T75 (Nest, Wuxi, China).

4.2 Determinación de la viabilidad celular.

Al finalizar los tiempos post-infección las células fueron tripsinizadas, unas fueron sembradas en placas de 96 pozos, para determinar la viabilidad. Para esto se sembraron 12.000 células infectadas o no infectadas las cuales fueron mantenidas en DMEM suplementado con SFB al 2% y AB 1%. Luego de la adhesión, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS, y se adicionaron 100 µL por pozo de calceína-AM 2,5 mM (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) resuspendida en DMEM sin rojo fenol (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente (TA). Finalmente se midió la fluorescencia utilizando un TECAN Infinite® 200 PRO (Switzerland) con longitudes de onda de 494 nm excitación y 517 nm emisión.

4.3 Determinación del porcentaje de infección por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Las células restantes, se sembraron sobre laminillas pretratadas con Poli-L-Lisina 10 ug/ml. Se sembraron 5000 células, las cuales se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 30 min, se lavaron con cloruro de amonio 50 mM y se permeabilizaron con tritón X 100 0,3% por 30 min a temperatura ambiente (TA). A continuación, se incubaron con suero de cabra al 10% y por 1 hora a 37 °C con el anticuerpo monoclonal (MAB 8744 Millipore, MA, USA) 1:500 para detectar la proteína viral E del virus.

Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti ratón (BA-9200 Vector, Burlingame, CA, USA) 1:200 y luego con una solución de estreptavidina acoplada a Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) 1:600. Finalmente, los núcleos se tiñeron con Hoechst (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) 1:1000 y las laminillas se montaron sobre láminas portaobjetos utilizando Vectashield Mounting Media®. Las células se observaron bajo microscopio Zeiss Axio Imager.A2 (Jena, Germany) utilizando el sistema de fluorescencia X-Cite® serie 120 Q y el software Zen 2012. Para el conteo diferencial de células infectadas y no infectadas se utilizó la herramienta cell counter del programa ImageJ® y se estableció el número total de células por campo y el número de células infectadas, luego se determinó el porcentaje de células infectadas y se calculó el promedio del porcentaje de células infectadas sobre el total de campos observados.

4.4 Aislamiento de los exosomas.

El protocolo descrito a continuación es una modificación de dos protocolos, el primero utilizado por *Barreto et al* (30) y el segundo por *Zhu et al* (45). A continuación, se describe en detalle.

Los sobrenadantes de las células infectadas y no infectadas, obtenidos a las 120 hpi se centrifugaron a 300 x *g* por 10 min a 4°C, luego el sobrenadante se centrifugó a 2000 x *g* por 20 min a 4°C (Rotina 380R rotor cat. 1754 Andreas Hettich GmbH & Co. KG Föhrenstr, Germany). Se tomó el sobrenadante y filtró en membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). El nuevo sobrenadante, se concentró en unidades de filtración Amicon Ultra-15 MWCO 100K (Merck Millipore Darmstadt Germany) a 4000 x *g* por 20 min a 4°C (Rotina 380R rotor cat. 1754. Andreas Hettich GmbH & Co. KG Föhrenstr, Germany). Finalmente, el concentrado se ultra-centrifugó (UC) a 100.000 x *g* por 60 min a 4°C (Optima MAX-TL, rotor TLS-55 factor K 100.2. Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA) y el pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de PBS y se almacenó a -80°C (Fig 3). El pellet obtenido del sobrenadante de células infectadas se denominó (P-CI), mientras que el pellet obtenido del sobrenadante de células no infectadas se identificó como (P-CNI).

4.5 Caracterización de los exosomas.

4.5.1 Cuantificación de proteínas por BCA.

Se tomaron 10 µL de los diferentes pellets (P-CI y P-CNI) obtenidos por UC y se cuantificó la concentración de proteína por BCA. Para ello se generó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) entre 0.062 a 1 µg/µL. Las muestras se incubaron a 37 °C por 45 min con la solución BCA-Cu₂SO₄ y se determinó la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro Stat Fax 3200 (Awareness Technology INC, FL, USA) a una longitud de onda de 565 nm con diferencial de 625 nm.

Figura 3. Diseño experimental.

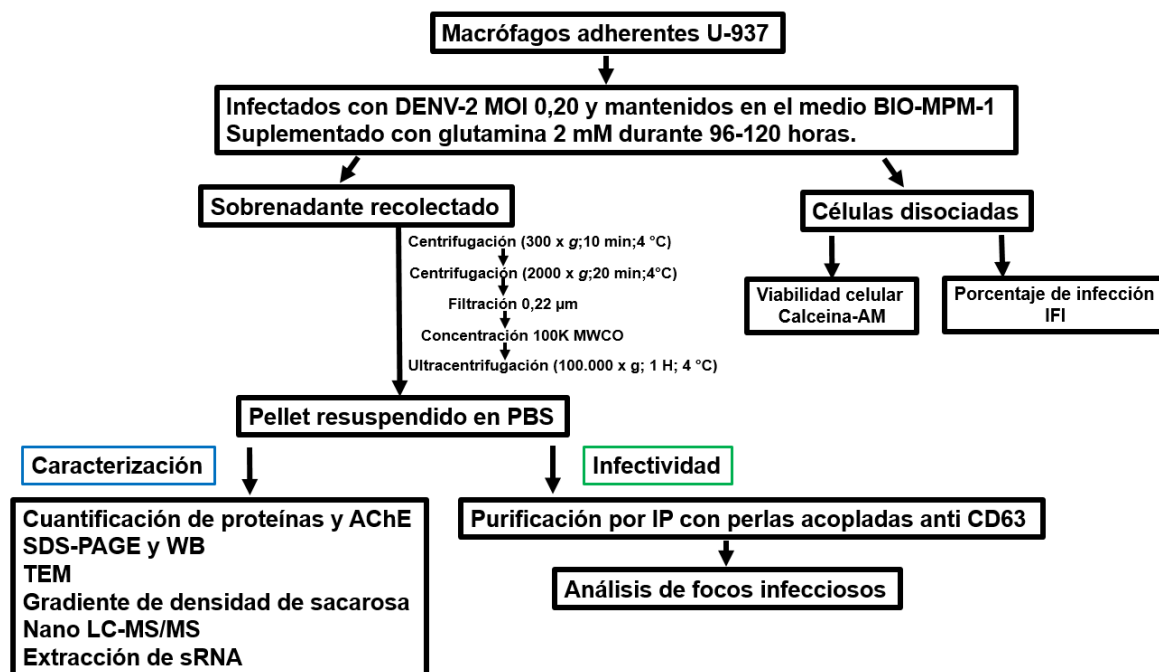


Diagrama del diseño experimental para el aislamiento y caracterización de las vesículas secretadas por macrófagos U-937 infectados o no infectados con el virus DENV-2.

4.5.2 Determinación de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE).

La determinación de la actividad de AChE se realizó con el kit Red Amplex® Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217) (Thermo Fisher, Rockford IL, USA). Se estableció una curva estándar a partir del stock de AChE (100 U/ml) en un rango de concentración entre 100 a 500 mU. Luego, los P-CI y P-CNI se diluyeron 1:10 en buffer de reacción y sobre este se adicionó la solución de trabajo (reactivo Red Amplex 400 µM, peroxidasa de rábano (HRP) 2 U/ml, colina oxidasa 0,2 U/ml y 100 µM de acetilcolina), y se incubó por 30 minutos a TA protegido de la luz. Como control positivo se utilizó AChE a una concentración de 200 mU y como control negativo buffer de reacción. Finalmente, las muestras se leyeron un TECAN Infinite® 200 PRO (Switzerland) a 530 nm excitación y 590 nm emisión.

4.5.3 Flotación de vesículas en gradiente de sacarosa.

Los P-CI y P-CNI se resuspendieron en 2 mL de una solución 2,5 M de sacarosa en buffer HEPES/NaOH 20 mM, esta suspensión se dispuso en la parte inferior de un gradiente lineal de sacarosa entre 2,5 hasta 0,5 M y se ultra centrifugó a 100.000 x g por 15 horas a 4°C centrifuga (Beckman L8-55M rotor SW41 factor K 256.6; Beckman Coulter. Inc. Fullerton, CA, USA) (44). Se recolectaron 10 fracciones de 1 mL desde la parte inferior del tubo y se le determinó la densidad mediante un refractómetro (ausJENA, Germany), las fracciones se diluyeron en PBS1X y se ultracentrifugaron de nuevo a 100.000 x g por 60 min (Optima MAX-TL, rotor TLA 100.3 factor K 60.6 Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA). Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en PBS y luego en buffer Laemmli 6X en condiciones reductoras para el análisis de proteínas por Western Blot.

4.5.4 SDS-PAGE, y Western Blot.

20 µg/µL de proteína de los P-CI y P-CNI se resuspendieron en buffer Laemmli 6X en condiciones denaturantes y las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de 10-12%. Una parte de estos geles fueron teñidos con nitrato de plata, el resto de los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL) por 3 horas y 0,140 Amp. Las membranas fueron incubadas con una solución Tris-HCl pH 7,5, Tween-20 al 0,5%, leche descremada y/o BSA y luego incubadas overnight con los anticuerpos primarios específicos para detectar las proteínas del complejo ESCRT: ALIX (3A9. Cell Signaling, Danvers, MA, USA) 1:1000 y TSG-101 (4A10 Thermo Fisher Scientific. Rockford IL, USA) 1:1000. La tetraspanina: CD63 (ab68418 ABCAM, Cambridge, MA, USA) 1:1000 e Histona 3 (H3) (4499 Cell Signaling, Danvers, MA, USA 1:2000). Proteínas virales: NS3 (46) (dilución 1:1000 para lisados celulares y 1:100 para pellets obtenidos por UC) y NS5 (dilución 1:1000). Finalmente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios específicos acoplados a HRP (NA931, IgG antiratón 1:1000. ECL Amersham™ Buckinghamshire, UK); (31460 IgG anticonejo 1:2000 Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA); y (31470 IgG anti-rata Thermo Fischer Rockford, IL, USA.) por 1 hora y reveladas con el sustrato SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) utilizando el documentador ChemiDoc™ Imaging System (BIO-RAD, Hercules, CA).

4.5.5 Análisis de proteínas por cromatografía líquida a nano-escala acoplada a espectrometría de masas en tándem (nano LC-MS/MS).

30 µg/µL de proteínas de los P-CI y P-CNI se resuspendieron en buffer Laemmli 6X en condiciones denaturantes, luego las proteínas se separaron por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10 % a 200 voltios durante 5 minutos, posteriormente se tiñó con Coomassie coloidal toda la noche. Finalmente se cortó una única banda por cada condición experimental y las muestras enviaron para análisis por nano LC-MS/MS, utilizando el servicio Alphalyse A/S (Odense, Dinamarca).

4.5.6 Microscopia electrónica de transmisión TEM.

Se tomaron 20 µL del P-CI y se fijó con PFA al 4 % y glutaraldehído al 2 % en PBS, posteriormente se sembraron entre 10 y 20 µL de la mezcla en rejillas de níquel de 200 mesh tratadas con Formvar™. Finalmente, las muestras fueron teñidas con citrato de plomo y acetato de uranilo y observadas bajo microscopio Zeiss EM109 (Jena, Germany).

4.5.7 Evaluación de RNA pequeños (sRNA) en vesículas purificadas de macrófagos U-937 infectados y no infectados.

Para la evaluación de RNA pequeños presentes las vesículas aisladas, se procedió de la siguiente manera. Para la extracción de RNA de las vesículas, los sobrenadantes concentrados por UF se incubaron por 1 hora a TA en agitación constante con RNAsa A (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) a una concentración final de 100 µg/mL. Posteriormente la suspensión se ultracentrifugó a 100.000 x g por 1 hora a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en el buffer de lisis del kit de extracción mirVana™ miRNA Isolation (Thermo Fisher, Rockford IL, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Sobre el lisado se agregó una solución de fenol ácido-cloroformo pH 4.5, se centrifugó y se tomó la fase acuosa y mezcla con etanol 1.25 volúmenes, luego la mezcla se sirvió en la columna y se centrifugó a 10.000 x g. La membrana fue lavada tres veces de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente se adicionaron 50µL del buffer de elución precalentado a 95°C y el RNA total se almacenó a -80 °C. El RNA fue analizado en calidad y concentración, utilizando el sistema de electroforesis capilar con el RNA Bioanalyzer utilizando el sistema Small RNA chip (47).

4.6 Evaluación de la infectividad de las vesículas secretadas por macrófagos U-937 infectados.

4.6.1 Inmunoprecipitación (IP) de las vesículas enriquecidas de exosomas utilizando perlas acopladas anti CD63.

Las vesículas aisladas por UC se purificaron por inmunoprecipitación (IP) utilizando el kit Exo-Flow96 Exosome IP Kits (Exo-Flow 32ACD63) (System Biosciences. Palo Alto, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. 50 µl de los pellets se incubaron toda la noche a TA y en agitación constante con 20 µl de perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti CD63. Posteriormente las perlas se inmovilizaron en una placa magnética y se tomó el sobrenadante libre de perlas (SLP), luego, las muestras se lavaron y se tomaron 20 µl de perlas acopladas a las vesículas para ser evaluadas por WB. El resto de los complejos perlas-vesículas se incubaron con el buffer de elución durante una hora a TA en agitación constante. Finalmente, las perlas se inmovilizaron y se colectó el sobrenadante con las vesículas intactas libres de perlas y se almacenaron a -80 °C. De esta forma, las vesículas purificadas de las células infectadas se denominaron (P-CI-IP), las vesículas purificadas de células no infectadas se denominaron (P-CNI-IP). Una alícuota de cada condición fue evaluada por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata y por WB para detectar la proteína ALIX, también se evaluó el SLP.

4.6.2 Análisis de focos infecciosos

Para determinar la capacidad infecciosa de las vesículas purificadas por IP se determinó el título viral a través de un análisis de focos infecciosos sobre células LLC-MK2. Para esto se sembraron 15.000 células/pozo en placas de 96 pozos y se expusieron a 20 µl de P-CNI-IP o P-CI-IP neutralizados previamente con el anticuerpo anti-Flavivirus D1-4G2-4-15 (4G2) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) (1,5 µg/mL por 1 hora a 37 °C). Como controles positivos las células se inocularon con virus DENV-2 a una MOI: 0,2 neutralizado o no con el anticuerpo anti D1-4G2-4-15, con el P-CI crudo (no IP). Como controles negativos se evaluaron células inoculadas con pellet P-CNI-IP y células no infectadas ni expuestas a las vesículas. Luego de 2 h de incubación se adicionó medio *overlay* semisólido y se mantuvieron las células por 72 horas. Al finalizar el tiempo, las células fueron fijadas con PFA al 4%, luego se permeabilizaron con tritón X-100 y se trataron con una solución de metanol al 50 % y H₂O₂ al 0,5 % para eliminar las peroxidasas endógenas. A continuación, se adicionó suero de cabra al 10% y se incubaron toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-flavivirus (MAB 8744 Millipore, MA, USA) 1:250 para detectar la proteína viral E del DENV. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti ratón (BA-9200 Vector, Burlingame, Ca, USA) 1:200 y con una solución de

estreptavidina acoplada a peroxidasa 1:100 (ab64269 Abcam, Cambridge, UK). Las células se incubaron por 30 min con la solución de revelado (3,3' tetrahidrocloreuro de diaminobencidina (DAB) al 0,1 % y H₂O₂ al 0,02 %), se detuvo la reacción con agua destilada y las células se contrastaron con Haemalum de Meyer. Bajo el microscopio Zeiss AxioVert40 (Jena, Germany) se determinaron las unidades formadoras de focos por mililitro. (UFF/mL) y se calculó el título viral utilizando la fórmula:

$$\text{UFF/mL: } P \times \text{FD} \times 50$$

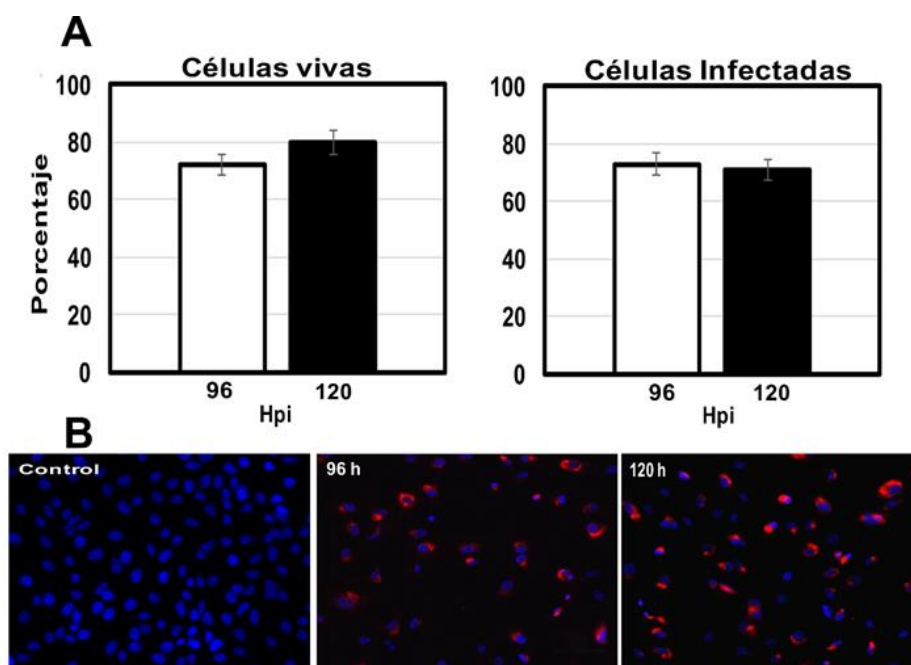
Donde P es promedio de focos contados; FD: factor de dilución. 50: factor de corrección para expresar el título en UFF/mL (1000ul/volumen de inóculo) (48).

5. RESULTADOS

5.1 Las células U-937 se mantuvieron viables luego de 120 horas post-infección.

Los macrófagos U-937 infectados se evaluaron a las 96 y 120 hpi. A las 96 horas el porcentaje de infección fue del 73% con una viabilidad del 72%. Mientras que a las 120 hpi, se encontró que el 71 % de células estaban infectadas con un porcentaje de viabilidad del 84 %, lo cual indicó que, a pesar de un tiempo tan prolongado, la infección no afectó de forma importante la viabilidad y permitió la proliferación celular sin alteraciones aparentes en el metabolismo, similar a lo observado en este mismo tiempo, en las células no infectadas (Fig. 4A). De acuerdo a estos resultados, para los siguientes experimentos se recolectaron los sobrenadantes a las 120 hpi debido al alto porcentaje de infección y viabilidad, lo que sugiere además una baja proporción de detritos celulares y los cuerpos apoptóticos presentes en los sobrenadantes, garantizando así el aislamiento y la posterior caracterización de los exosomas (Fig. 4B).

Figura 4. Porcentaje de infección y viabilidad celular de macrófagos U-937 infectados con el DENV-2



A. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por calceína-AM. A las 96 horas de infección a una MOI de 0,2 se encontró un porcentaje de células vivas del 72 % y a las 120 horas del 84 %. Por cada tiempo post infección se realizaron dos cultivos independientes con 8 réplicas por condición (n=16). **B.** El porcentaje de infección se determinó por IFI detectando la proteína E del virus. A las 96 horas el porcentaje de infección fue del 73% y del 71 % a los 120 h. Por cada tiempo post infección se realizaron 10 réplicas en dos experimentos independientes (n=20).

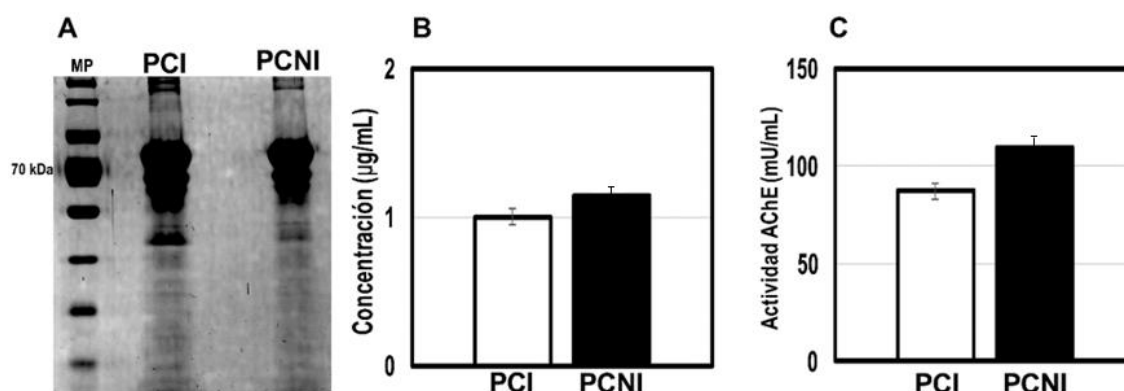
5.2 El protocolo estandarizado permitió obtener vesículas, con una concentración de proteínas y la actividad de la AChE similar respecto al control.

La literatura sugiere que existen varios protocolos para el aislamiento de exosomas, sin embargo, no todos son eficientes ni garantizan su total pureza. Para intentar garantizar y mejorar la obtención de las vesículas, en nuestro protocolo combinamos dos técnicas para aumentar la eficiencia de la recolección. Para tal fin los sobrenadantes fueron centrifugados a bajas fuerzas g (300 y 2000 $\times g$), luego este sobrenadante se filtró (membrana de 0,22 μm) para eliminar detritos celulares y vesículas con un tamaño superior a los 220 nm, respectivamente (30). Posteriormente, estos sobrenadantes se procesaron por ultrafiltración (UF) utilizando un dispositivo de filtración Amicon Ultra15 con un *cut-off* de peso molecular (MWCO) de 10 kDa, lo que permitió concentrar el volumen en aproximadamente 240 veces, garantizando así una recuperación del material superior al 80 % (49). Por último, las vesículas fueron aisladas por UC a 100.000 $\times g$ por 1 h a 4 °C. La implementación de la UF, nos permitió concentrar las vesículas y eliminar proteínas solubles junto a partículas con pesos moleculares por debajo del MWCO del filtro (49), lo que disminuyó en gran medida los agregados de proteínas que se forman durante el proceso de UC que pueden interferir en los análisis posteriores (Figura complementaria 1).

Luego de garantizar la infección y la supervivencia de las células a las 120 hpi, se evaluó la concentración de proteínas y la actividad de la AChE de las vesículas aisladas (Fig 5B-C).

De esta forma se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas (*t-student* $p=0,73$) y en la actividad de AChE (*t-student* $p=0,06$) entre las vesículas aisladas de células no infectadas (P-CNI) e infectadas (P-CI). Esta similitud entre las diferentes condiciones se confirmó por SDS/PAGE y tinción con nitrato de plata de los pellets obtenidos (5-A). En este ensayo se observó un patrón de bandas similar en las dos condiciones, donde las bandas que con mayor nitidez entre 95 y 43 kDa probablemente corresponden a proteínas que suplementan el medio de cultivo y que posiblemente sedimentaron junto a las vesículas en el proceso de UC. Estos resultados sugieren que la infección por el DENV-2 no interfirió en la producción y secreción de las vesículas.

Figura 5. Evaluación de la secreción de las vesículas mediante SDS-PAGE, concentración de proteínas y actividad de AChE.



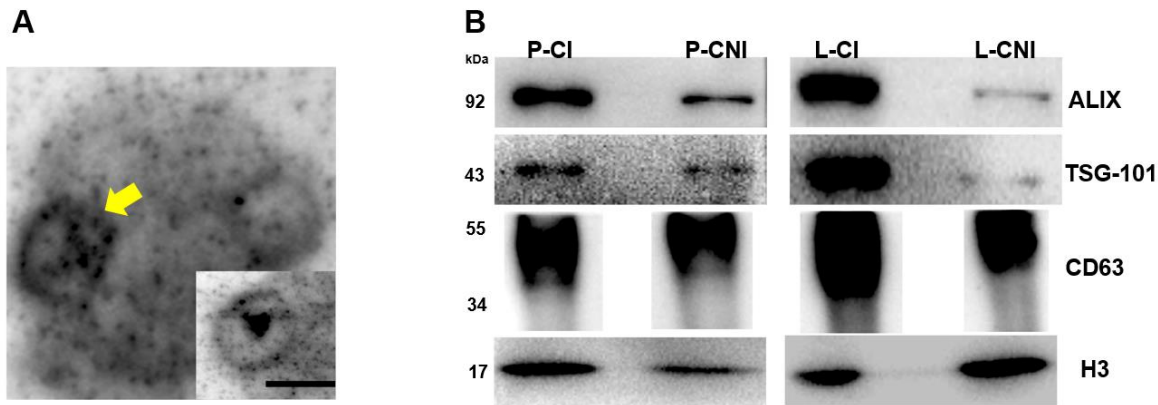
A: SDS-PAGE al 10 % teñido con nitrato de plata. Marcador de peso molecular (MW) (Thermo Scientific, Rockford IL). Se sembraron 15 µg/µl de proteína de los pellets P-CI y P-CNI. La imagen muestra un patrón de bandas similar en las dos condiciones experimentales, donde claramente se distinguen con mayor resolución las bandas que se encuentran entre 43 y 95 kDa. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. **B:** Cuantificación de proteínas por BCA. 10 µl de los pellets obtenidos a las 120 horas postinfección de sobrenadantes de células infectadas (P-CI) o inoculadas con medio (P-CNI) se diluyeron en 90 µl de la mezcla BCA/sulfato cúprico y se determinó la concentración de proteínas. La concentración del pellet CI fue de 1.0 µg/µl, y del pellet de CNI fue de 1.1 µg/µl. Por cada condición experimental se realizaron 2 réplicas de dos experimentos independientes (n=4). **C:** Actividad de AChE. 10 µl de los pellets obtenidos a las 120 hpi se diluyeron en 90 µl de buffer de reacción y se determinó la actividad de esta enzima como se describió en materiales y métodos. La concentración de esta enzima en el pellet P-CI fue de 87 mU mientras que para el pellet P-CNI fue de 109 mU. Por cada condición experimental se realizaron 2 réplicas de dos experimentos independientes (n=4).

5.3 Las células U937 infectadas y no infectadas produjeron subpoblaciones de vesículas constituidas por proteínas del complejo ESCRT, la tetraspanina CD63 e H3.

Siguiendo con la caracterización, se evaluó por TEM el pellet P-CI, observándose vesículas redondeadas de aproximadamente 100 nm con una depresión central que les confiere forma de copa, siendo esto último producto del proceso de fijación que altera su morfología (12) (Fig 6A). También se evaluaron por WB, algunas de las proteínas que comúnmente se reportan como proteínas constitutivas de vesículas y específicamente de los exosomas. Para esto, una parte del pellet obtenido por UC, se procesó por SDS-PAGE y WB. De esta forma se encontró que las vesículas purificadas de las células infectadas y no infectadas -al parecer-, están enriquecidas de exosomas los cuales fueron positivas para la tetraspanina CD63 y las proteínas ALIX y TSG-101 (Fig 6B), lo cual confirma su origen endosomal. De manera interesante se encontró que tanto ALIX como TSG-101 presentaron bandas más definidas e intensas cuando se evaluaron los lisados o los pellets provenientes de células infectadas, en comparación con lo observado en las muestras de células no infectadas. Esto sugiere que la infección

por DENV-2 aumentó la expresión y el empaquetamiento de estas proteínas en este tipo de vesículas, y que probablemente el virus las use para su beneficio, sin embargo, es necesario realizar un análisis riguroso para validar esto último.

Figura 6. Caracterización de las vesículas por WB y TEM.



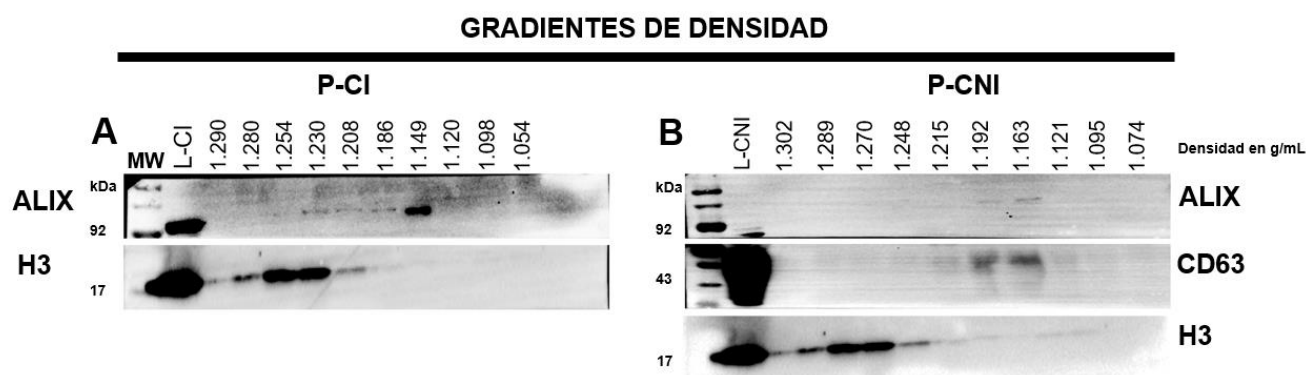
A: Micrografía realizada por MET. La flecha amarilla indica un exosoma secretado por células infectadas. Barra de magnificación: 100 nm. **B:** Los pellets de células infectadas (P-CI) o no infectadas (P-CNI), obtenidos por UC fueron evaluadas por Western Blot para la identificación de las proteínas celulares ALIX, TSG-101, CD63 e H3. Como control se utilizaron lisados de células infectadas (L-CI) o no infectadas (L-CNI). Se sembraron entre 15 o 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína de lisados celulares o pellets obtenidos por UC respectivamente. Las vesículas secretadas por macrófagos infectados o no infectados, fueron positivas para los marcadores ALIX, TSG-101, CD63 y para la histona H3. Imágenes representativas de 5 experimentos independientes.

Luego de obtener estos datos se procedió a evaluar la densidad de las vesículas aisladas. Para ello se utilizó la centrifugación en gradiente que separa las vesículas de otras estructuras, según su densidad. Los gradientes se generaron manualmente y luego de una UC inicial, cada fracción se recolectó y UC de nuevo, para recolectar los diferentes pellets. Luego, estos fueron procesados por SDS-PAGE y WB. De esta manera se observó que la mayoría de las vesículas aisladas se concentraron entre las fracciones 4 y 5 que correspondieron a las densidades 1,14 y 1,19 g/mL, respectivamente, lo que sugiere que las vesículas obtenidas son mayoritariamente exosomas, coincidiendo con las reportadas previamente en otros modelos celulares (6).

Por WB, se observó que las vesículas obtenidas de células infectadas se encontraron entre las fracciones 4, 5 y 6 que correspondieron a las densidades 1,14, 1,19 y 1,20 g/mL, respectivamente. Estas vesículas mostraron una banda densa que correspondió a la proteína ALIX y una banda con menor

intensidad para la H3. Mientras que, entre las fracciones 7 y 8 que correspondieron a las densidades 1,23 y 1,25 g/mL se detectó intensamente la proteína H3 y en menor proporción ALIX (Fig. 7A). Las vesículas de las células no infectadas, mostraron un perfil similar. En estos, los marcadores ALIX y CD63 se detectaron principalmente entre las fracciones 4, 5 y 6 que correspondieron a las densidades entre 1,16, 1,19 y 1,21 g/mL y en menor proporción entre las fracciones 7 y 8 que correspondieron a las densidades 1,24-1,28 g/mL. En estas últimas, se detectó intensamente la proteína H3 (Fig. 7B).

Figura 7. Gradiente de densidad de sacarosa.



Los pellets de células infectadas y no infectadas obtenidos por UC se sembraron en un gradiente de sacarosa (0,5 hasta 2,5 M) y se ultracentrifugaron a 100.000 x g durante 15 horas. Posteriormente se recolectaron 10 fracciones (F1-F10) se les determinó la densidad y nuevamente se ultracentrifugaron a 100.000 x g, los pellets resultantes fueron evaluados por WB para la identificación de las proteínas ALIX y H3 en el caso del P-CI (**A**) y ALIX, CD63 y H3 en el caso del P-CNI (**B**). Imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Esto indica que las células infectadas secretan poblaciones de exosomas con densidades bajas entre 1,14 y 1,20 g/mL enriquecidas con ALIX, y exosomas con densidades altas entre 1,23 y 1,25 g/mL, enriquecidas mayoritariamente con H3. De acuerdo a estos resultados, sugerimos que las vesículas obtenidas en nuestro modelo son en su mayoría exosomas, sin embargo, es posible que los pellets obtenidos contengan otro tipo de vesículas como los cuerpos apoptóticos, por ello creemos necesario hablar en general de vesículas extracelulares (ECVs).

Otra parte de los pellets, se evaluó por espectrometría de masas. De esta forma confirmamos en los P-CI y en P-CNI la presencia de las proteínas detectadas por WB y de otras proteínas, consideradas canónicas como enolasa, ubiquitina, tetraspaninas, Hsc70, heparan sulfato y anexinas (Tabla.1). También se observó que las vesículas en ambas condiciones presentaron un alto contenido de peptidasas, lo que confirma su origen endosomal. Interesantemente, en el P-CI se identificaron péptidos

de proteínas que probablemente estén relacionadas con la respuesta inmune entre ellas: IL-6, C3, el inhibidor de la metaloproteinasas, un fragmento de la cadena pesada de la inmunoglobulina gamma 1 y la proteína de unión a galectina-3 (receptor scavenger).

Tabla 1. Listado de proteínas identificadas por nano MS/MS LC de las vesículas producidas por los macrófagos U-937 infectadas y no infectadas.

PELLET P-CI			PELLET P-CNI		
FUNCIÓN	PROTEÍNA	NÚMERO DE PEPTIDOS	FUNCIÓN	PROTEÍNA	NÚMERO DE PEPTIDOS
PÉPTIDASAS	CATHEPSYN L1	5	PÉPTIDASAS	CATHEPSYN L1	5
	ALPHA 1			ALPHA1	4
	ANTITRYPSIN	5		ANTITRYPSIN	
	LEGUMAIN	1		LEGUMANIN	2
	SERPIN1	1		CATHEPSYN Z	1
	CATHEPSYN Z	1		SERPIN1	1
	DIPEPTIDIL PEPTIDASE 7	2	FORMACIÓN DE LOS MVBs	ALIX	1
FORMACIÓN DE LOS MVBs	ALIX	2		UBIQUITINA	5
CHAPERONAS	UBIQUITINA	5	OTRAS	SPARC	6
	HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 70	3		POLYUBIQUITIN	2
	CLUSTERIN	1		ENOLASE	1
TETRASPANINAS	CD81	1		ANNEXIN A5	1
	CD9	1		HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN	1
RESPUESTA INMUNE	INMUNOGLOBULIN HEAVY CONSTANT GAMMA 1 (FRAGMENT)	1		TRANSSTHYRETIN	1
	IL6	1		CALSYNTENIN1	1
	GALECTIN-3-BINDING PROTEIN	3			
	METALLO PROTEINASE INHIBIDOR	2			
	C3	1			
	14-3-3.THETA	3			
OTRAS	14-3-3 GAMMA	3			
	ENOLASE	3			
	SPARC	9			
	ANNEXIN A2	1			
	ANNEXIN A1	1			
	GAPDH	1			
	PDI	1			
	POLI UBIQUITIN	3			

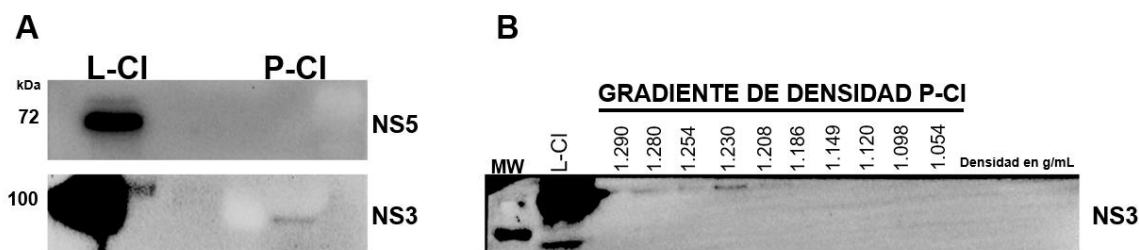
Proteínas identificadas por nano LC-MS/MS .Por cada condición se cargó 30 µg/µl de los P-CI o P-CNI los cuales fueron procesados por SDS-PAGE y posteriormente teñidos con Coomassie coloidal. Las proteínas se agruparon por su función molecular reportada y se muestra el número de péptidos identificados por MS/MS. Las proteínas identificadas en los P-CI fueron mayor en todos los casos evaluados.

5.4 Las vesículas de las células U937 infectadas transportan la proteína NS3 del virus.

Dado el interés de definir si las ECVs de las células U937 infectadas transportan alguna o algunas de las proteínas virales, evaluamos en estas la presencia de las proteínas virales NS3 y NS5.

Siguiendo el protocolo descrito previamente, por WB se evaluó la presencia de estas proteínas observando la presencia únicamente de la proteína NS3 en las vesículas de las células infectadas (Fig 8A). De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización, evaluamos en los gradientes de densidad en que fracciones se ubicaron las vesículas positivas para NS3. De esta forma se encontró que las vesículas que la transportan, fueron las vesículas densas, enriquecidas en H3 ubicados entre las fracciones 6, 7, 8 y 9 que correspondieron a las densidades 1,20, 1,23, 1,25 y 1,28 g/mL (Fig 8B). La presencia de NS3 en estas vesículas es un hallazgo novedoso y sugiere que esta proteína y otras como la IL-6 empaquetadas en vesículas, podrían activar células no infectadas vecinas o células que se encuentran distantes y de esta manera iniciar, incrementar o atenuar la respuesta inmune.

Figura 8: Identificación por WB de las proteínas virales NS3 y NS5 en ECVs secretadas por células infectadas.



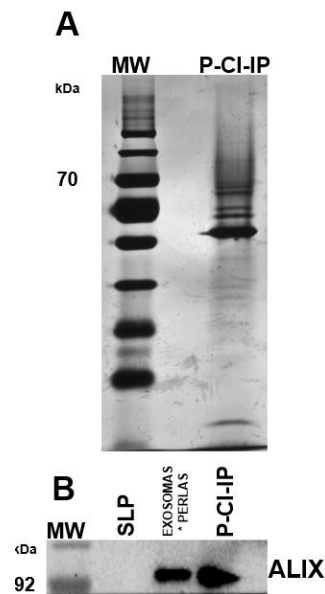
Los lisados (L-CI) y pellets de células infectadas (P-CI) obtenidos por UC fueron evaluados por Western Blot para la identificación de las proteínas virales NS3 y NS5 (**A**). Se sembraron entre 15 o 25 µg/µL de proteína de lisados celulares o pellets obtenidos por UC respectivamente. Las vesículas secretadas por macrófagos infectados fueron positivas solo para la proteína NS3 con un peso aproximado de 70 kDa. Los P-CI se sembraron en un gradiente de sacarosa (0,5 hasta 2,5 M) y se ultracentrifugaron a 100.000 x g durante 15 horas. Posteriormente se recolectaron 10 fracciones (F1-F10) se les determinó la densidad y nuevamente se ultracentrifugaron a 100.000 x g, los pellets resultantes fueron evaluados por WB para la identificación de la proteína NS3 la cual se identificó entre las densidades 1,20-1,28 g/mL (**B**). Imagen representativa de 2 experimentos independientes.

5.5 Las vesículas secretadas por macrófagos U937 infectados transportan micro RNA (miRNA) pero no partículas virales o RNA infeccioso.

Una vez caracterizados las ECVs obtenidas de macrófagos U-937 infectados por el DENV-2, se purificaron mediante inmunoprecipitación (IP) con perlas acopladas a un anticuerpo anti CD63 para eliminar partículas virales y otras moléculas que sedimentaron con estas vesículas durante la UC y de esta manera obtener vesículas libres de virus, para posteriormente realizar el estudio de focos infecciosos y determinar la infectividad de las vesículas exosomas purificadas.

En la figura 9A se muestra el patrón de bandas del pellet inmunoprecipitado (P-CI-IP), donde se observó la disminución en el número e intensidad de bandas entre los 45 y 70 kDa, en relación con lo observado en el gel obtenido del pellet de células infectadas (P-CI) (Fig 5A), lo que sugiere que a pesar del proceso de IP persisten algunos agregados de proteínas contaminantes posiblemente asociados a las vesículas purificadas.

Figura.9 Inmunoprecipitación (IP) de las ECVs con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD63.



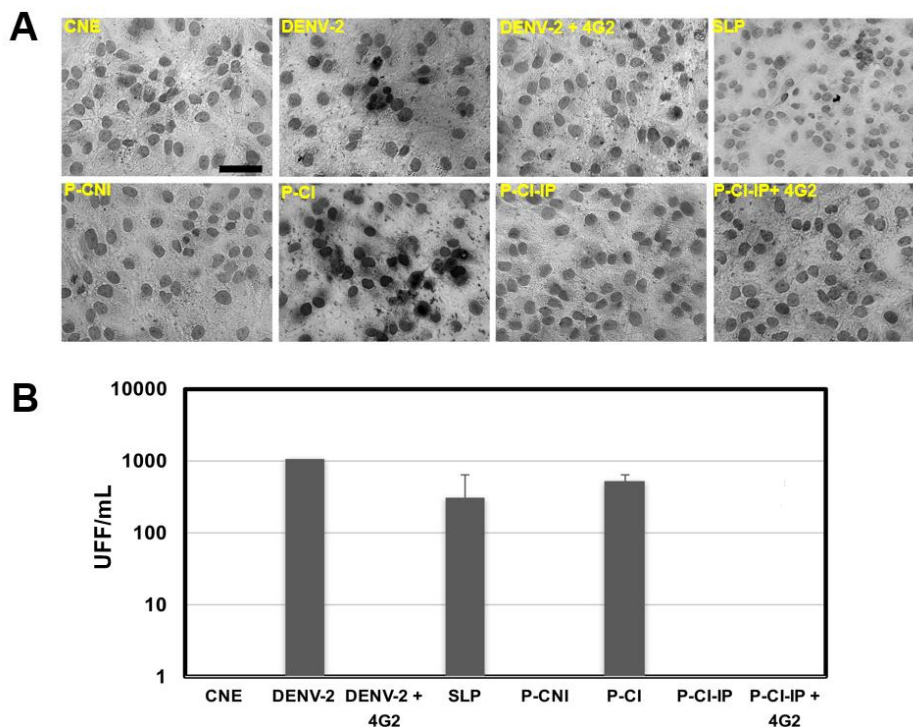
A: SDS-PAGE teñido con nitrato de plata, muestra el perfil de proteínas obtenidas luego de la IP (P-CI-IP). **B:** Identificación por WB de la proteína ALIX en los exosomas acoplados a perlas y en los exosomas eluidos libre de perlas (P-CI-IP). Como control negativo se evaluó el sobrenadante libre de perlas (SLP). Como se describió en la metodología.

Al evaluar por WB estas vesículas, se confirmó la presencia y el enriquecimiento de la proteína ALIX en las vesículas acopladas a las perlas luego del tiempo de incubación y en vesículas libres de perlas, mientras que el sobrenadante libre de perlas (SLP) fue negativo para esta proteína (Fig.9B), esto último confirma la eficiencia de la IP para concentrar y purificar las ECVs presentes en el pellet.

Para determinar si el DENV-2 utiliza a estas ECVs para transportar partículas virales y/o RNA viral, como un posible mecanismo para amplificar la infección, se inocularon células LLC-MK2 con vesículas purificadas por IP. Luego de 72 horas, las células se procesaron por inmunoperoxidasa para determinar el número de focos infecciosos.

La figura 10A, muestra que únicamente se detectó antígeno viral cuando las células LLC-MK2 fueron expuestas al pellet crudo de células infectadas o al SLP, con títulos virales de $5,3 \times 10^2$ UFF/ml y $3,0 \times 10^2$ UFF/ml, respectivamente (10B). Esto indica que en el pellet obtenido luego de la UC sedimentaron partículas virales infecciosas las cuales fueron eliminadas luego de la IP.

Figura 10. Evaluación de la capacidad de infección de las ECVs producidas por las células U-937 infectadas con el DENV-2.

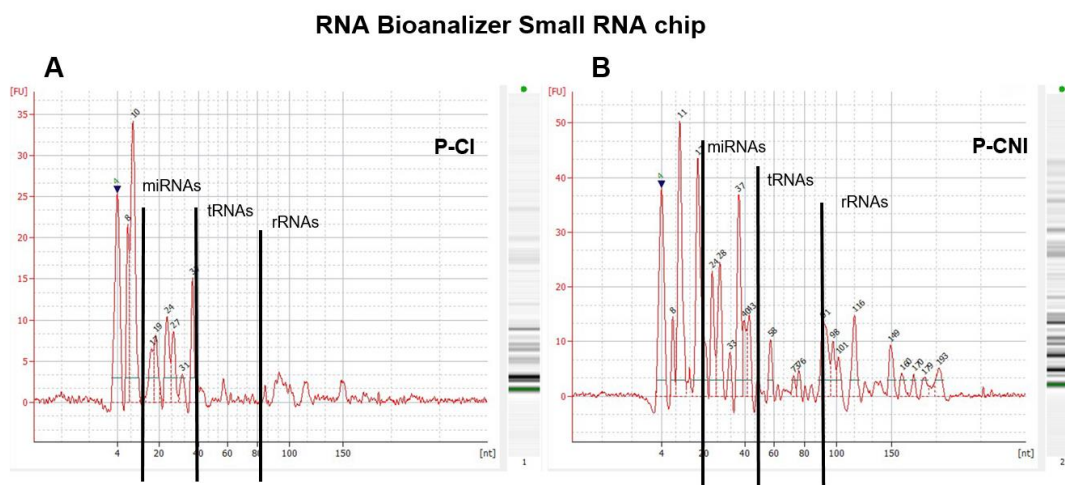


A: Evaluación por inmunoperoxidasa de la presencia de la proteína E viral en células LL-MK2 inoculadas con las diferentes condiciones evaluadas: células no expuestas (CNE), Inoculadas con el virus (DENV-2). Barra de magnificación de 50 μ m. **B** título viral obtenido en luego de exponer las células LLC-MK2 a las diferentes condiciones evaluadas, expresados en UFF/mL (ver en materiales y métodos). Se cuantificó virus infeccioso únicamente cuando las células fueron expuestas al inóculo viral (control positivo), al sobrenadante libre de perlas (SLP) y a las vesículas obtenidas luego de la ultra-centrifugación.

Por otro lado, se evaluó la presencia de pequeños RNA en las ECVs de las células infectadas, ya que esta es una de las características más relevantes de los exosomas como mediadores de la comunicación intercelular. Por consiguiente, previo a la extracción del RNA de las ECVs, el medio concentrado luego de la ultrafiltración se incubó con RNasa A para eliminar el RNA contaminante, luego de esto se siguió el protocolo de extracción de RNA pequeños (sRNAs) y se determinó su tamaño y concentración. En la figura 11 se muestra el perfil de los sRNA extraídos de los pellets de células infectadas (A) y no

infectadas (B). A través del electroesferograma se observó en los P-CI y los P-CNI la presencia de miRNAs con un tamaño entre 18 y 40 nt, sin embargo, hubo una ligera diferencia en el patrón e intensidad de los picos entre condiciones, observando a una concentración más alta de miRNA en los P-CNI. De igual modo en ambas muestras se identificaron según el perfil del electroferograma RNA ribosomales y de transferencia, también con concentraciones diferentes.

Figura 11. Presencia de RNA pequeños (sRNA) en exosomas obtenidos de células U-937 infectadas y no infectadas.



Electroferograma de RNA pequeños extraído vesículas secretadas por células infectadas P-CI **(A)** y no infectadas P-CNI **(B)** con concentraciones de RNA de 4,58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 6,62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente. Se observa que las vesículas presentaron RNAs con tamaños entre 15 y 40 nt que corresponde a miRNA. De igual forma se observan en ambas condiciones otros RNA corresponderían a RNA de transferencia y RNA ribosomales.

6. DISCUSIÓN

El estudio de vesículas extracelulares incluidos los exosomas, como mediadores de la comunicación intercelular durante las infecciones virales ha generado gran interés durante los últimos años, sin embargo, hasta ahora se tiene muy poca información acerca de las características de estas vesículas cuando son secretadas por células infectadas por el DENV-2.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, sugerimos que las vesículas obtenidas y caracterizadas son en su mayoría exosomas, sin descartar la presencia de otro tipo de vesículas como los cuerpos apoptóticos, por ello creemos necesario hablar en general de vesículas extracelulares (ECVs) secretadas por macrófagos U-937 infectados o no infectados con el DENV-2.

Estas vesículas extracelulares enriquecidas de exosomas, presentaron una morfología, tamaño y densidad de flotación similares a las ya descritas para los exosomas en otros modelos celulares (6). De igual forma encontramos que las ECVs secretadas por estas células fueron heterogéneos y que la infección no modificó de manera evidente la actividad de la enzima AChE, tomada como una medida indirecta de la producción de los exosomas. Adicionalmente, se encontró que estas vesículas contienen entre otras proteínas ALIX, TSG101, CD63, H3, anexina, enolasa y ubiquitina. Lo que confirma la universalidad de estas vesículas y de las proteínas ALIX y TSG101 y CD63 en estas, independiente del tipo celular. Sin embargo, cuando se evaluaron por WB las proteínas ALIX y TSG101, en los lisados y los pellets de células infectadas y no infectadas, se evidencio un cambio de intensidad de estas, sugiriendo que la infección induce su producción.

Las proteínas ALIX y TSG101 participan en la formación de las ILV en los MVB mediante el complejo ESCRT y al parecer en la producción del DENV. La participación de TSG101 durante la infección por el DENV-2 fue reportada por *Tabata et al*, quienes disminuyeron en células infectadas por DENV-2 la expresión de la proteína utilizando siRNA específicos y observaron una disminución dramática del título viral, sugiriendo que esta proteína es esencial para la producción del virus, y proponen que TSG101 podría actuar como una proteína adaptadora para reclutar a otras proteínas del complejo ESCRT como CHMP2/3 y CHMP4 las cuales participan en la invaginación de la membrana del retículo endoplásmico donde sucede la formación del complejo de replicación y de las partículas virales (50). Interesantemente, en el mismo estudio, la depleción de ALIX no tuvo ningún impacto en la

producción del virus, a pesar de que el análisis proteómico indicó un incremento de esta proteína en la fracción citosólica de las células infectadas (50). Esto último ya había sido reportado en células endoteliales infectadas con el DENV-2, donde se resaltó que la interacción de ALIX con el ácido lisobifosfatídico (LBPA) -uno de los lípidos predominantes en la membrana de los MVB-, favorece el desnudamiento del virus en el endosoma tardío y la posterior replicación del RNA genómico (51). De acuerdo con esta evidencia, se sugiere entonces que el DENV-2 aumenta la producción de las proteínas ALIX y TSG101 las cuales -al parecer-, participan en los procesos del ciclo viral que suceden sobre membranas (desnudamiento, producción asociada a ER, liberación), aumentando así vez la probabilidad de empaquetamiento de estas proteínas en vesículas como las ILV que posteriormente son liberadas como exosomas. También es posible que la misma proteína NS3 arrastre a proteínas como ALIX y TSG101 hacia las ILV, ya que estas al parecer interactúan de manera directa o indirecta como ha sido reportado previamente durante la infección con otros Flavivirus (52-53).

Adicionalmente, en nuestro modelo observamos de manera sorprendente que las ECVs secretadas por las células U937 infectadas, transportan la proteína NS3 del virus. Este hallazgo es supremamente interesante debido a su novedad y a la discusión que abre respecto al papel que podrían desempeñar estas vesículas en la patogenia de la enfermedad. En nuestro modelo, identificamos la NS3 en el pellet crudo de ECVs y en las fracciones del gradiente de sacarosa con densidades entre 1,20 y 1,28 g/mL, coincidiendo con los marcadores ALIX y H3. De igual forma encontramos otras poblaciones de vesículas negativas para NS3, pero positivas para H3 con densidades menores o iguales a 1,15 g/ml. Estos hallazgos confirman la heterogeneidad de las vesículas, específicamente de los exosomas, definida por los mecanismos que controlan la formación de estas vesículas que pueden ser dependientes o independientes de ESCRT, los cuales pueden actuar en la misma célula, inclusive en un mismo MVBs (54). Sin embargo, la función biológica de estas vesículas heterogéneas no se conoce, como también se desconoce, la función de la NS3 en estas vesículas.

La proteína NS3 de los Flavivirus se detecta en el citoplasma de las células infectadas y es determinante en el ciclo viral ya que desempeña -gracias a sus dominios serina proteasa, RNA helicasa y RTPasa/NTPasa-, varios roles esenciales en el procesamiento de la poliproteína viral, la replicación del RNA genómico y el ensamble de las partículas virales (55). También participa junto a la proteína hHSC70 en la regulación negativa de la respuesta

inmune innata, desplazando a la proteína de unión a dsRNA (TRBP) impidiendo la formación del complejo de silenciamiento inducido (RISC) y favoreciendo la replicación viral (56).

De acuerdo a lo observado en otros modelos virales, sugerimos que NS3 podría tener un rol determinante en la presentación del antígeno e inicio de la respuesta inmune. NS3 es considerada un potente estimulador de la inmunidad mediada por células, debido a la gran cantidad de epítopes que contiene, los cuales son reconocidos principalmente por los linfocitos T CD8+ (57).

El procesamiento del antígeno transportado a través de vesículas como los exosomas pudiera ocurrir por vías diferentes, dependiendo del mecanismo de internalización de la vesícula por parte de la célula receptora. Por ejemplo, si el exosoma es internalizado por endocitosis, macropinocitosis o fagocitosis, su contenido podría ser degradado en el endolisosoma o el fagolisosoma y los péptidos de NS3 podrían ser cargados al CMH II. Por otra parte, si los exosomas se funden con la membrana plasmática de la célula blanco y descarga su contenido en el citoplasma, NS3 podría ser procesada a través del proteosoma y los péptidos translocados al ER y cargados en moléculas del CMH I, mediante un mecanismo denominado *cross presentation* en el cual los antígenos exógenos son presentados a través del CMH I. Esto ocurre generalmente en células dendríticas, cuando es crítica la respuesta primaria por parte de linfocitos T CD8+ *naïve* (58), clave en la patogenia de la enfermedad del dengue.

Finalmente, nuestros resultados, son el primer reporte que sugiere que la infección por DENV-2 induce cambios en la composición de las vesículas extra-citoplasmáticas enriquecidas de exosomas, aumentando el empaquetamiento de ciertas proteínas canónicas, que pudieran tener otro tipo de función durante la infección a las ya descritas y posiblemente sean la clave para determinar la relación entre la patogénesis del DENV-2 y los exosomas. Adicionalmente las vesículas que transportan NS3 podrían activar y estimular constantemente las células presentadoras de antígenos profesionales como macrófagos y células dendríticas, y otros tipos como las células endoteliales y los fibroblastos, que podrían participar en la presentación antigénica o reconocer péptidos de NS3 presentados a través del CMH I o II, iniciando o potenciando la respuesta inmune e induciendo junto a otras proteínas como la IL6 la diferenciación de linfocitos T y B.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

De esta manera podemos concluir que las ECVs secretadas por los macrófagos infectados por el DENV-2, son heterogéneos con diferentes contenidos proteicos y de RNAs, los cuales podrían generar diferentes respuestas en las células receptoras iniciando y/o amplificando la respuesta inmune celular. Sin embargo, falta por determinar: i) si todos los tipos celulares susceptibles al virus producen vesículas que transportan NS3 u otras proteínas virales, ii) caracterizar las proteínas y otras moléculas bioactivas como RNA viral, mRNA y/o miRNA que se transportarían en estas, iii) y las variaciones en su composición según el tipo celular y serotipo infectante. También se debe determinar cómo estas vesículas influyen en el desequilibrio inmune que conlleva a las formas graves de la enfermedad por ejemplo la disfunción endotelial y otras anormalidades en la hemostasia.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Rep.* 2014; 47(10): 531–539. doi 10.5483/BMBRep.2014.47.10.164
2. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends. *J Cell Biol.* 2013; 200(4): 373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138.
3. Revenfeld ALS, Baek R, Nielsen MH, Stensballe A, Varming K, Jorgensen M. Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clin Ther.* 2014; 36(6):830-46. doi: 10.1016/j.clinthera.2014.05.008.
4. Costaguta G, Payne GS. Overview of protein trafficking mechanisms. In: Nava S, Alfonso A, Donaldson J. *Trafficking inside cells: pathways, mechanisms and regulation.* Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; 2009. P105-18.
5. Van Der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012; 64 (3): 676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983.
6. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30: 255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
7. Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci.* 2002; 115 (Pt 12): 2505-15.
8. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R; Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutical potentials. *Biochim Biophys.* 2012; 1820(7):940-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017.
9. Griffiths G, Back R, Marsh M. A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J Cell Biol.* 1989; 109(6 Pt 1): 2703-20.
10. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor Downregulation and multivesicular body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(12): 893-905.
11. Waldenstrom A, Ronquist G. Role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ Res.* 2014; 114(2):315-24. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300584.

12. Février B, Raposo G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16(4):415-21. doi: 10.1016/j.ceb.2004.06.003
13. Katzmman DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin dependent sorting into the multivesicular pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex ESCRT-I. *Cell.* 2001; 106(2):145-55.
14. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol.* 2015; 6:203. doi: 10.3389/fimmu.2015.00203.
15. Kowal J, Trach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014; 29(1): 116-25. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.
16. Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicles. *Dev Cell.* 2007; 12(5):671-82. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.005.
17. Urbanelli L, Magini A, Buratta S, Brozzi A, Sagini K, Polchi A, et al. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel).* 2013; 4(2):152-70. doi:10.3390/genes4020152.
18. Thery C, Boussac M, Verón P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 2001;166(12):7309-18. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>.
19. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosome. *Science.* 2008; 319(5867):1244-7. doi: 10.1126/science.1153124.
20. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune response. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(8):581-93. doi: 10.1038/nri2567
21. Yañez-Mo M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015; 4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
22. Singh Chahar H, Bao X, Casola A. Exosomes and their role in the life cycle and pathogenesis. *J Biochem Res.* 2014; 4(6):653-65. doi: 10.3390/v7062770

23. Kapoor NR, Kumar V. Emerging Role of exosomal secretory pathway in human tumor virus pathogenesis. *J Biochem Res.* 2014; 4(6):653-65.10.9734/IJBcRR/2014/9370.
24. Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. Endosomes, exosomes and trojan viruses. *Trends Microbiol.* 2004; 12(7):310-6. doi: 10.1016/j.tim.2004.05.004.
25. Fujii Y, Otake K, Tashiro M, Adachi A. Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ Cells. *FEBS Lett.* 1996; 393(1):93-6.
26. Campbell TD, Khan M, Huang MB, Bond VC, Powel MD. HIV-1 Nef protein is secreted into vesicles that can fuse with target cells and virions. *Ethn Dis.* 2008; 18(2 Suppl.2): S2-14-9.
27. Das SR, Jameel S. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res.* 2005; 121(4):315-32.
28. Flanagan J, Middeldorp J, Sculley T. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP1 to exosomes. *J Gen Virol.* 2003; 84(7):1871-9.10.1099/Vir018944-0
29. Wurdinger T, Gatson NN, Balaj L, Kaur B, Breakefield XO, Pegtel DM. Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways. *Adv Virol.* 2012; 2012:767694. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/767694>.
30. Alfonso Barreto, Luz-Stella Rodríguez, Olga Lucía Rojas, Marie Wolf, Harry B. Greenberg, Manuel A. Franco, and Juana Angel. Membrane Vesicles Released by Intestinal Epithelial Cells Infected with Rotavirus Inhibit T-Cell Function. *Viral Immunol.* 2010; 23(6): 595–608. doi: 10.1089/vim.2009.0113.
31. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Decembre E, Chung J, Whitten-Bauer C, et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cells Host Microbe.* 2012; 12(4):558-70. doi: 10.1016/j.chom.2012.08.010.
32. Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stapino L, Colombatto , Brunetto M. et al. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol.* 2004; 34(10):2834-42. doi: 10.1002/eji.200424887.
33. Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, Habersetzer F, Pan Q, Ruiter PE De, et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh 7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110(32):13109-13. doi: 10.1073/pnas.1221899110.

34. Lai CK, Saxena V, Tseng CH, Jeng KS, Kohara M, Lai MMC. Non structural protein 5A is incorporated into hepatitis C virus low-density particle through interaction with core protein and microtubules during intracellular transport. *Plos One*. 2014; 9(6): doi: 10.1371/journal.pone.0099022.
35. Guzman MG, Garcia G, Kouri G. Dengue fever and hemorrhagic dengue: research priorities. *Rev Panam Salud Pública*. 2006; 19(3):204-15.
36. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84(2):200-7. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0503
37. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015; 84(2); 453-65. doi 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
38. Navarro-Sánchez E, Després P, Cedillo Barrón L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of Medical Research*. 2005; 36(5):425-35. DOI: 10.1016/j.arcmed.2005.04.007.
39. Velandia ML, Castellano JE. Dengue virus: structure and viral cycle viral. *Infectio*. 2011;15(571):33-43. doi: 10.1016/S0123-9392(11)70074-1.
40. Ramírez A, Fajardo A, Moros Z, Gerder M, Caraballo G, Camacho D, et al. Evolution of dengue virus type 3 genotype III in Venezuela. diversification, rates, and population dynamics. *Virol J*. 2010; 7(1):329. doi: 10.1186/1743-422X-7-329.
41. Nour AM, Li Y, Woulensky J, Modis Y. Viral membrane fusion and nucleocapsid delivery into the cytoplasm are distinct events in some Flaviviruses. *Plos Pathog*. 2013; 9(9):e1003585.
42. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of dengue virus replication and assembly sites. *Cells Host Microbe*. 2009; 5(4):202-16 doi: 10.1016/j.chom.2009.03.007.
43. Martinez-Gutierrez M, Castellanos JE, Gallego-Gómez JC. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*. 2011; 54(4):202-16. 19 doi: 10.1159/000321892.

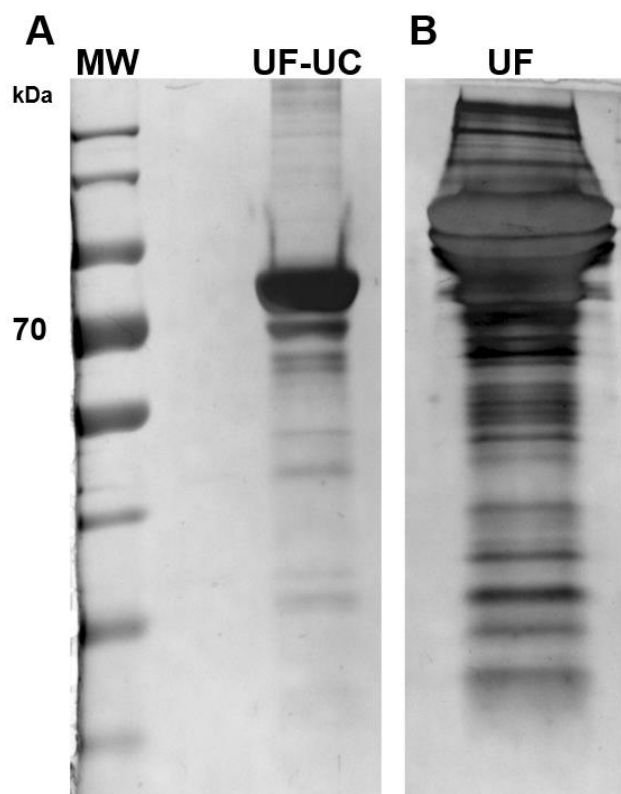
44. Castro-Mussot ME, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA. Respuesta inmune e inmunopatogenesis en las infecciones con el virus dengue. *Gac Med Mex.* 2013; 149(5):531-40.
45. Zhu X, He Z, Yuan J, Wen W, Huang X, Hu Y, Lin C, Pan J, Li R, Deng H, Liao S, Zhou R, Wu J, Li J, Li M. IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cell Microbiol.* 2015;17(1):105-18. doi: 10.1111/cmi.12339.
46. Morales L, Velandia ML, Calderon MA, Castellanos JE, Chaparro-Olaya J. Polyclonal antibodies against the recombinant NS3 protein of dengue virus. *Biomedica.* 2017 Jan 24; 37(1):131-140. doi: 10.7705/biomedica.v37i1.3249.
47. Yuan T, Huang X, Woodcock M, Du M, Dittmar R, Wang Y, Tsai S, Kohli M, Boardman L, Patel T, Wang L. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci Rep.* 2016; 6:19413. doi: 10.1038/srep19413.
48. Medina F, Medina JF, Colón C, Vergne E, Santiago GA, Muñoz-Jordán JL. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol.* 2012; Chapter 15: Unit 15D.2. doi: 10.1002/9780471729259.mc15d02s27.
49. Coumans F, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees Esther, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res.* 2017;12; 120(10):1632-1648. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309417.
50. Tabata K, Arimoto M, Arakawa M, Nara A, Saito K, Omori H, et al. Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep.* 2016; 30;16(9):2339-47. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.068.
51. Pattanakitsakul SN, Pounsawai J, Kanlaya R, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. Association of Alix with late endosomal lysobisphosphatidic acid is important for dengue virus infection in human endothelial cells. *J Proteome Res.* 2010; 3;9(9):4640-8. doi: 10.1021/pr100357f.
52. Carpp LN, Galler R, Bonaldo MC. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes Infect.* 2011; 13(1):85-95. doi: 10.1016/j.micinf.2010.10.010.

53. Chun-Tang Chiou, Chih-Chi Andrew Hu, Pi-Hsin Chen et al. Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *J Gen Virol*. 2003; 84(Pt 10):2795-805. doi: 10.1099/vir.0.19201-0.
54. Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KE, Sadik M5, Alaarg A, Smith CI4, Lehtiö J, El Andaloussi S, Wood MJ, Vader P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*. 2016; 6: 22519. doi: 10.1038/srep22519.
55. Gebhard LG, Iglesias NG, Byk LA, Filomatori CV, De Maio FA, Gamarnik AV. A Proline-Rich N-Terminal Region of the Dengue Virus NS3 Is Crucial for Infectious Particle Production. *J Virol*. 2016; 12;90(11):5451-61. doi: 10.1128/JVI.00206-16.
56. Kakumani PK, Rajgokul KS, Ponia SS, et al. Dengue NS3, an RNAi suppressor, modulates the human miRNA pathways through its interacting partner. *Biochem J*. 2015; 471(1):89-99. doi: 10.1042/BJ20150445.
57. Mathew A, Townsley E, Ennis FA. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future Microbiol*. 2014;9(3):411-25. doi: 10.2217/fmb.13.171.
58. Janice S. Blum, Pamela A. Wearsch and Peter Cresswell. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 443–473. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910.

9. ANEXOS

9.1 Figuras complementarias.

9.1.1 Figura complementaria 1.



Tinción con nitrato de plata del pellet obtenido luego de ser UF y UC (A) y del sobrenadante concentrado por UF (B). Esta figura muestra la efectividad del proceso de ultra-centrifugación para decantar proteínas contaminantes presentes en el sobrenadante concentrado por ultra-filtración.