



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DE LA POSIBLE TRANSMISIÓN VIRAL POR MICROVESÍCULAS
DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS DURANTE LA INFECCIÓN POR EL
VIRUS DEL DENGUE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

BIOL. EXP. JESSICA ALEJANDRA MATEOS RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL

**DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**DR. LUIS PADILLA NORIEGA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, D. F. Diciembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi papá, Máximo, que me enseñó el valor del trabajo arduo y la pasión traducida en responsabilidad hacia lo que uno hace. Estaré siempre agradecida por tu fe en mí, por tu apoyo, paciencia, sabiduría, entereza y amor infinito. Estarás en mi mente en cada meta que cumpla en mi vida, pero más importante, estarás en mi corazón en las inevitables caídas y tu grave voz resonará en mis oídos, repitiéndome que sea fuerte, así como siempre lo fuiste tú.

A mi mamá, Eusebia, a la que le debo la vida y la persona que soy ahora. Esta tesis es tan tuya como mía. Siempre careceré de palabras para expresarte lo maravilloso que ha sido ser tu hija y la increíble mamá que eres. Particularmente te agradezco el desvelo, estrés, fatiga, confusión, desesperación y pesadumbre que has compartido conmigo y sufrido con el fin de ver mis sueños realizados. Sentiré admiración eterna por la entrega que has demostrado por amor y quien está orgullosa de tenerte en su vida como madre, en cada etapa, soy yo.

A mi madrina, Elsa, por su constante compañía, apoyo, complicidad y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al programa del Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, por permitirme llevar a cabo mis estudios de Maestría. Asimismo, la realización de este trabajo no habría sido posible sin el apoyo de una beca de excelencia otorgada por el CONACyT 549666.

Adicionalmente agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado **(PAEP)** por los apoyos otorgados para la asistencia al “Workshop: Extracellular vesicles and parasites. Mexico City” y al “Annual Meeting of the American Society for Exosomes and Microvesicles (ASEMV 2015). Marco Island, Florida, USA.”

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Blanca Ruiz Ordaz, por la oportunidad que me brindó de formar parte de su laboratorio, correr el riesgo de abrir en éste una nueva línea de investigación, donde seríamos pioneros y permitirme acrecentar la pasión de estudiar un virus hemorrágico. Por su tiempo, paciencia, compromiso docente, protección, entusiasmo científico, comprensión y constante apoyo académico y personal. Por alentarme a generar un compromiso conmigo misma, priorizar mi crecimiento profesional y creer en mí como futura científica.

A la Dra. Verónica Monroy, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación. Por compartir pacientemente su conocimiento científico y por su asesoría en el manejo del equipo empleado, así como en las técnicas de cultivo celular, amplificación y titulación viral, ultracentrifugación diferencial, cuantificación de proteínas, extracción, purificación y cuantificación de RNA, RT-PCR y electroforesis. Por su cálida compañía, palabras de aliento y sabios cuestionamientos.

A mi comité tutorial, la Dra. Marcela Lizano y el Dr. Luis Padilla, por su confianza, asesoría, y compromiso científico.

Al Dr. Iván Quevedo, por su apoyo afable e incondicional, por su apertura, ayuda e interés en la estandarización del análisis por rastreo de nanopartículas llevado a cabo en la Universidad Iberoamericana; por su confianza y ética profesional.

A la Dra. Lourdes Agredano, por su valioso apoyo en el procesamiento de las muestras y obtención de las imágenes por microscopía electrónica. Por su amable ayuda.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mi tía Petrita, mi tío Juanito, mis hermanitos menores, Aylin y Juanetito, mis hermanos mayores, Anubis y Alfredo, a mis sobrinas, Karla y Danubio, a mis primos, Chela, Carlos, Bety, Toño y Memo, por su compañía, cariño y apoyo.

A mis colegas y amigos de laboratorio:

A Hugo, el “sensei”, por su veracidad y compromiso científico, por las enriquecedoras discusiones, pertinentes cuestionamientos y acertados análisis, por su paciencia, constante enseñanza y severa amistad. A Eli, por su carisma, prudencia y solidaridad, por su confianza y tierna amistad. A Héctor, por su constante atención, oído abierto y palabras de aliento. A Gaby Fuentes, por su asesoría en la citometría de flujo, cuantificación de proteínas y valiosa amistad, por sus consejos, correcciones y discusiones científicas. Y particularmente, a Pedro Pablo, por ser parte de la “exclusiva comunidad Exosomiana”, por interesarse en el proyecto, proponer, mejorar, cuestionar, por las perspicaces sugerencias y discusiones, por su incansable apoyo y ayuda en múltiples experimentos, por su lealtad y excepcional ñoñez, por enriquecer este proyecto de investigación, por alentarme a creer en mí misma, por la alegría que trajo a mi vida su increíble amistad.

A mis amigos de la maestría, Jonathan y Ana, por emprender esta etapa juntos y motivarme en cada oportunidad.

A mis amigos de vida, Angie y Margarito, por estar presentes en cada momento, feliz o desafortunado, por su constante apoyo e incansable compañía. Por los gratos momentos, comprensión y cariño incondicional.

A mis amigas Loni y Noemí, por su invaluable apoyo y consejos en momentos difíciles, por compartir conmigo la pasión y terapia del baile, por la linda amistad que hemos cultivado.

A Erick Liquitaya, por su ayuda en la traducción de las imágenes y palabras de aliento.

A Karina Torres, por su compañía y consejos desde el inicio de esta etapa.

A mi Mor, Adhemar, por su ayuda en la traducción de las imágenes, así como en el ordenamiento de la bibliografía, por sus sugerencias, comentarios, cuestionamientos, discusiones, profundos análisis y correcciones acertadas. Por su interés, apoyo incondicional, por las increíbles perspectivas que aporta a mi vida diariamente, tanto profesionales como personales, por su ejemplo de vida, por su esfuerzo diario, por su admiración, por su invaluable ternura que alumbra mi vida, por su paciencia, por el equipo que hemos formado poco a poco, por la alegría, comprensión e inconmensurable amor que me alienta cuando el desánimo predomina. Por haber llegado a mi existencia y quedarse, por su fe en mí.

“Cuando hay demasiados ciervos en el bosque o demasiados gatos en el granero, la naturaleza restaura el equilibrio mediante la introducción de una enfermedad contagiosa o un virus.”

- Rusty James

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Epidemiología.....	3
1.2 El Virus Dengue.....	5
1.3 Ciclo de replicación del Virus Dengue.....	8
1.4 Cuadro clínico.....	10
1.4.1 Fase febril	11
1.4.2 Fase crítica.....	12
1.4.3 Fase de recuperación	12
1.5 Factores de predisposición del Dengue grave.....	13
1.6 Patogénesis del Dengue	14
II. ANTECEDENTES	17
2.1 Vesículas extracelulares	17
2.2 Exosomas	19
2.3 Formación de los exosomas.....	19
2.3.1 Formación de las vesículas intraluminales en los MVBs dependiente de ESCRT	21
2.3.2 Formación de las vesículas intraluminales en los MVBs independiente de ESCRT	23
2.3.3 Formación de las vesículas intraluminales en los MVBs mediada por tetraspaninas	24
2.4 Composición de los exosomas y función biológica.....	26
2.5 Exosomas en enfermedades infecciosas.....	30
2.6 Exosomas y Virus Dengue.....	37
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
IV. HIPÓTESIS.....	41
V. OBJETIVO GENERAL.....	41
5. 1 Objetivos particulares.....	41
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1 Diseño experimental	42

6.2 Cultivo, amplificación y titulación del virus Dengue empleando la línea celular LLC-MK2.....	43
6.3 Obtención de suero fetal bovino libre de exosomas.....	44
6.4 Cultivo de monocitos humanos de la línea celular THP-1	44
6.5 Obtención de exosomas derivados de monocitos humanos de la línea celular THP-1 por ultracentrifugación diferencial.....	45
6.6 Caracterización de exosomas derivados de monocitos humanos de la línea celular THP-1 por citometría de flujo	47
6.7 Caracterización morfológica de los exosomas derivados de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus del Dengue por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	49
6.8 Purificación de exosomas por gradiente continuo de velocidad de OptiPrep™ (Iodixanol)	50
6.9 Análisis por rastreo de nanopartículas (NTA).....	53
6.10 RT-PCR.....	55
6.11 Ensayo de co-cultivo.....	57
VII. RESULTADOS.....	58
7.1 Cultivo, amplificación y titulación del virus Dengue empleando la línea celular LLC-MK2.....	58
7.2 Placa lítica.....	59
7.4 Caracterización de exosomas derivados de monocitos humanos de la línea celular THP-1 por citometría de flujo	60
7.5 Caracterización morfológica de los exosomas derivados de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus Dengue por microscopía electrónica (obtenidos por ultracentrifugación diferencial).....	62
7.6 Análisis por Rastreo de Nanopartículas de las EVs derivadas de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus Dengue	64
7.7 Caracterización morfológica de los exosomas derivados de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus Dengue por microscopía electrónica (obtenidos mediante filtración)	68
7.8 Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las fracciones individuales	70
7.9 Citometría de flujo de las fracciones individuales	72
7.10 Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las fracciones combinadas (1-2, 5-6-7 y 11-12)	74
7.11 Citometría de flujo de las fracciones combinadas.....	77

7.12 Caracterización morfológica por Microscopía Electrónica (EM) de las vesículas presentes en las fracciones combinadas obtenidas por gradiente continuo de velocidad de OptiPrep™ (Iodixanol)	79
7.13 Identificación del genoma viral del DENV en las Fracciones combinadas 1-2, 5-6-7 y 11-12 obtenidas por gradiente de velocidad de Iodixanol	80
7.14 Ensayo de co-cultivo.....	81
7.14.1 RT-PCR.....	81
VIII. DISCUSIÓN.....	83
VII. CONCLUSIONES	92
VIII. PERSPECTIVAS.....	94
BIBLIOGRAFÍA	95

ABREVIATURAS

ABs. Anticuerpos

AChE. Acetilcolinesterasa

ACLY. ATP citrato liasa

ADAM17. Metaloproteasa 17 o Enzima activadora del factor de necrosis tumoral α

ADE. Amplificación dependiente de anticuerpos

AHCY. Adenosilhomocisteninasa

ALIX. Proteína de interacción de muerte celular programada 6

ARF1. Factor 1 de ribosilación del ADP

ATP1A1. Proteína Sodio/Potasio-ATPasa subunidad catalítica alfa-1

ATP5B. ATP sintasa subunidad β mitocondrial

CCT2. Chaperonina que contiene el complejo TCP1

CD1b. Cluster de diferenciación 1 b

CD9. Cluster de diferenciación 9

CD10. Antígeno Común de la Leucemia Linfoblástica Aguda

CD59. Glicoproteína inhibidora de MAC

CD63. Tetraspanina codificada por el gen CD63

CD81. Cluster de diferenciación 81

CD82. Cluster de diferenciación 82

CDC42. Proteína de control de división celular 42

CNP. 2',3'-nucleótido 3'-fosfodiesterasa

DCs. Células dendríticas

DENV. Virus Dengue

DENV-2 NGC. Virus Dengue serotipo 2 Nueva Guinea C

DPP4. Dipeptidil peptidasa-4

DYNC1H1. Dineína citoplasmática 1 de cadena pesada 1

EBV. Virus Epstein-Barr

EHD1. Proteína que contiene el dominio EH 1

EHD4. Proteína que contiene el dominio EH 4

ESCRT 0, I, II, III. Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte 0, I, II, III

EVs. Vesículas extracelulares

FASN. Sintasa de ácidos grasos

GAPDH. Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa

GSTP1. Glutati6n S-transferasa Pi 1

HAV. Virus de la Hepatitis A

HBV. Virus de la Hepatitis B

HCV. Virus de la Hepatitis C

HIV. Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HLA-DR1. Sistema del antígeno leucocitario humano relacionado al antígeno D 1

Hpi. Horas post infecci6n

Hrs. Tirosín-cinasa reguladora del sustrato del factor de crecimiento de hepatocitos

HSPs. Proteínas de choque térmico

HSPA5. Proteína de choque térmico de la familia A, miembro 5

HSP60. Proteína de choque térmico 60

HSP70. Proteína de choque térmico 70

HSP90. Proteína de choque térmico 90

HTLV-1. Virus linfotrópico de células T humanas

IFITM3. Proteína transmembranal inducida por interfer6n 3

IFN- α e IFN- γ . Interfer6n alfa y gamma

ILVs. Vesículas intraluminales

IQGAP1. Proteína de activaci6n tipo Ras GTPasa

KSHV. Herpes virus del Sarcoma de Kaposi

LAMP1. Proteína de membrana asociada a lisosoma 1

LDH. Lactato deshidrogenasa

LGALS3BP. Proteína de uni6n a Galectina 3

LMP1. Proteína latente de membrana 1 del virus Epstein-Barr

MCV. Poliomavirus de las células de Merkel

MDH1. Malato deshidrogenasa 1

MFGE8. Proteína factor EGF globular 8 de la grasa de leche

MHC II. Complejo mayor de histocompatibilidad clase II

MIF. Factor inhibitorio de la migración de Macrófagos

MOI. Multiplicidad de infección

MPs. Micropartículas

MVB. Cuerpo multivesiculado

NKs. Células Natural Killer

NRAS. Homólogo del oncogén viral de Neuroblastoma RAS

P4HB. Subunidad beta de la prolil 4-hidroxilasa

PDCD6. Proteína de muerte celular programada 6

PDIA3. Proteína disulfuro isomerasa A3

PEBP1. Proteína de unión a la fosfatidiletanolamina 1

PGK1. Fosfoglicerato cinasa 1

PFU. Unidades formadoras de placas

PIGR. Receptor polimérico de inmunoglobulinas

PKM2. Isoenzimas de Piruvato Cinasa M1/M2

PS. Fosfatidilserina

PMEL. Proteína de melanocito ó Proteína de Premelanosoma

RAC1. Sustrato 1 de la toxina C3 de botulinum asociado a Ras

RALA. Proteína Ral-A asociada a Ras

RAN. Proteína Nuclear asociada a Ras

RPS3. Proteína Ribosomal S3

RRAS2. Proteína asociada a Ras 2

SFB. Suero Fetal Bovino

SLC9A3R1. Regulador del antipordador 3 de Sodio-protón

STAM1 y STAM2. Molécula adaptadora transductora de señales 1 y 2

TEM. Microscopio de transmisión electrónica

TEMs. Microdominios enriquecidos de tetraspaninas

THBS1. Trombospondina 1

TNF- α . Factor de Necrosis Tumoral α

TPL1. Locus de progresión tumoral 1

TSG101. Gene de susceptibilidad a tumores 101.

VCP. Proteína que contiene valosina.

VPH. Virus del Papiloma Humano.

VPS4. Proteína asociada a la clasificación de la proteína vacuolar 4 A.

VTA1. Vesícula de tráfico 1 o Proteína homóloga a VTA1 asociada a la clasificación de la proteína vacuolar.

14-3-3. Proteínas reguladoras que se unen a más de 200 proteínas señalizadoras en todas las células eucariotas

RESUMEN

Las vesículas extracelulares son fragmentos celulares que se liberan al medio extracelular ya sea de forma constitutiva o por inducción y participan de manera importante en la comunicación intercelular; entre éstas se encuentran las micropartículas, los cuerpos apoptóticos y los exosomas. En el contexto del proceso infeccioso, los exosomas son las vesículas extracelulares más estudiadas actualmente; los exosomas miden de 30 a 120 nm y se forman a partir de la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana celular. El contenido y función de los exosomas varía de acuerdo al estímulo por el cual fueron liberados y a la célula de la cual se originan. Estas microvesículas tienen un papel importante en diferentes procesos biológicos, como la inmunoadactivación o inmunosupresión, en el transporte de proteínas y ácidos nucleicos, así como en la transferencia de diferentes moléculas derivadas de diversos agentes patógenos. Asimismo, la participación de los exosomas en la transmisión viral ha sido recientemente documentada; se ha descrito para el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus Epstein Barr, el Pegivirus humano, el virus de la Hepatitis A y para el virus de la hepatitis C. Sin embargo, su participación durante la infección por el virus Dengue no ha sido aún elucidada. En el presente proyecto nos propusimos evaluar si durante la infección de monocitos humanos (células diana) por el virus Dengue, se genera la producción de exosomas que puedan contener ya sea la nucleocápside viral y/o partículas virales completas y, de esta manera, puedan participar en el proceso infeccioso de la línea celular de monocitos humanos THP-1 como un exosoma “troyano”. La posible generación de exosomas “troyanos” durante la infección por el virus Dengue, como ruta alterna de infección, evasión o modulación de la respuesta inmune, se plantea como un proceso importante que podría establecer las bases de los mecanismos por los cuales algunos pacientes pueden progresar a las formas graves de la enfermedad (con la posibilidad de escapar al sistema inmune y/o por la diseminación sistémica del virus Dengue).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que los monocitos humanos THP-1 infectados con el virus Dengue, son capaces de producir vesículas que corresponden al tamaño de los exosomas (mediante análisis por rastreo de

nanopartículas), así como exosomas CD63 positivos. Los cuales, de acuerdo a los ensayos tanto de microscopía electrónica como de RT-PCR, pueden contener tanto RNA viral como viriones completos. Con base en los datos obtenidos, proponemos por primera vez la generación de exosomas “troyanos” derivados de monocitos THP-1 durante la infección por el Virus Dengue. Lo cual, puede representar una vía alterna de infección celular, así como un posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped, explicando tanto la progresión a dengue severo, como la persistencia antigénica observada en los casos desafortunados de la enfermedad.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

El Dengue es una enfermedad viral aguda y sistémica, ocasionada (Acosta *et al.*, 2014) por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV) el cual es transmitido al humano por mosquitos del género *Aedes*. De acuerdo a la Organización Mundial de la (OMS) es considerada la enfermedad arboviral más importante a nivel mundial, ya que el 50% de la población mundial vive en áreas de riesgo de contraer la infección (WHO, 2009). Más de 125 países son endémicos para el Dengue y, aunque la enfermedad se presenta principalmente en regiones tropicales y sub-tropicales del sureste de Asia, América, el pacífico occidental, África y el mediterráneo oriental (Fig. 1), actualmente se ha extendido fuera de estos límites debido a múltiples factores, como la migración de poblaciones, el cambio climático, el incremento en los viajes, el comercio, la amplia dispersión del mosquito vector, entre otros. Estos factores favorecen también el incremento en la incidencia de las formas severas de la enfermedad (Acosta *et al.*, 2014; Bhatt *et al.*, 2013; Guzman and Harris, 2015; WHO, 2009).

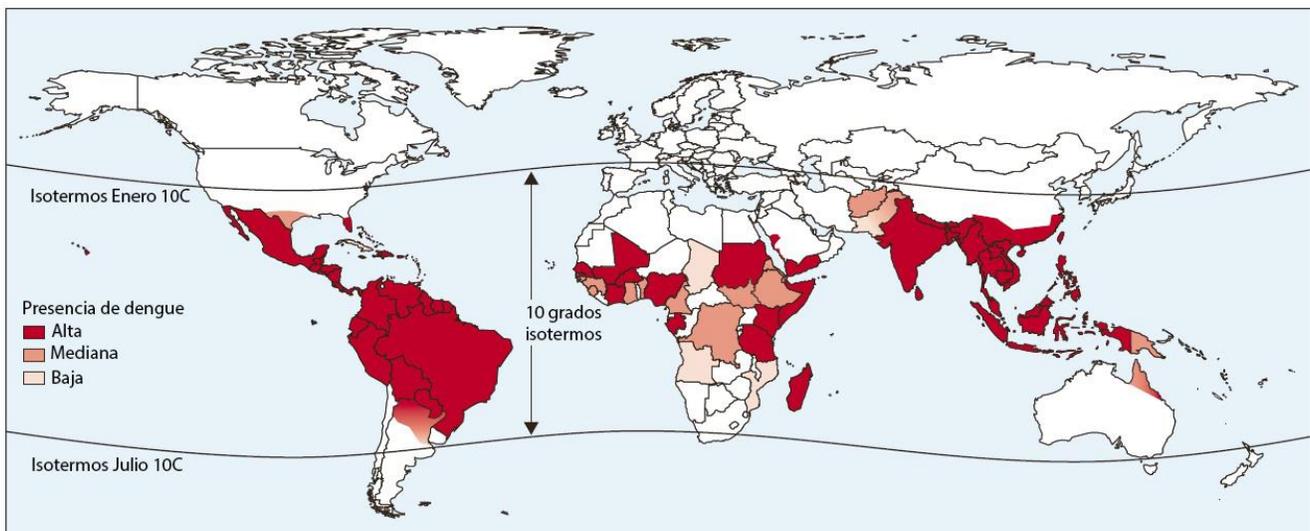


Figura 1. Distribución global del Dengue; las líneas de contorno de los isotermos de enero y julio indican los posibles límites geográficos de los hemisferios norte y sur para la supervivencia durante todo el año del mosquito *Aedes aegypti*, principal vector de los virus del Dengue (Guzman and Harris, 2015; WHO, 2009).

La OMS reporta que aproximadamente tres cuartas partes de la población global expuesta al dengue vive en Asia, siendo la principal causa de hospitalización y muerte de niños en la región. Los brotes epidémicos se presentan aproximadamente cada 3 a 5 años en la región del sudeste asiático. Tanto el número de casos reportados como la severidad de la enfermedad actualmente se han incrementado. Las formas graves de dengue son endémicas en casi todos los países pertenecientes a esta zona geográfica, siendo las tasas de severidad hasta 18 veces más elevadas en comparación con la región de América central y del sur. Se atribuye el 75% de la carga global de la enfermedad por dengue a las regiones del pacífico occidental y del sudeste asiático, incrementando continuamente, el número de casos reportados. La transmisión del DENV se ha extendió a la región europea, cuando el mosquito *Ae. albopictus* se estableció en Europa en 1990 como resultado del incremento en el comercio de llantas usadas. En la región oriental mediterránea, el dengue está clasificado como una “enfermedad emergente”, los casos oficialmente reportados se han presentado en las últimas dos décadas (WHO, 2009).

A pesar de que el continente más afectado es el asiático, con aproximadamente el 70% de las infecciones anuales totales, en el continente americano se dieron aproximadamente el 14% de infecciones aparentes a nivel mundial, de las cuales, la mitad ocurrieron en Brazil y en México (Bhatt *et al.*, 2013). De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en su último reporte de abril de 2016, reporta 43,056 casos de Dengue y Dengue Severo en Norte América, América Central y México, de los cuales, 18,561 corresponden a casos confirmados en México con una tasa de letalidad del 0.2 (PAHO, 2016).

En el año 2015, la Dirección General de Epidemiología reportó que en México se presentaron 2,310 casos confirmados de Fiebre por Dengue (FD) y Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD); para el 2016, hasta el 11 de abril, se reporta un incremento del 24.1% de los casos confirmados en comparación a los casos reportados en la misma semana epidemiológica del 2015, reportándose así 2,866 casos confirmados de FD y FHD. El 58% de los casos corresponden a los estados

de Guerrero, Chiapas, Veracruz, Tabasco y Nuevo León; donde el estado de Guerrero es el que presenta la incidencia más alta de 19.87 (incidencia de casos por FD y FHD por 100 mil habitantes). Asimismo, los serotipos circulantes de acuerdo al Instituto de Referencia y Diagnóstico Epidemiológico (InDRE) son predominantemente el 1 con el mayor número de casos, seguido del serotipo 2, 3 y el serotipo 4 con el menor número de casos (SINAVE/DGE, 2016).

A la fecha, no existe una vacuna totalmente segura y/o una terapia antiviral específica, por lo que el control y prevención de la enfermedad está basada en el control efectivo del vector, mientras que el tratamiento se enfoca en la detección y manejo clínico temprano; reduciendo así la tasa de letalidad por Dengue a menos del 1% (WHO, 2009). No obstante, actualmente ya hay distintas propuestas de vacunas en diferentes etapas de desarrollo, principalmente aquellas que consisten en una mezcla tetravalente de virus atenuados, las cuales se encuentran en las etapas más avanzadas de prueba. Entre éstas, la vacuna desarrollada por Sanofi-Pasteur, denominada de manera comercial como Dengvaxia®, es la primer vacuna en ser comercializada por autoridades mexicanas para la prevención del Dengue causado por los cuatro serotipos del virus en preadolescentes, adolescentes y adultos que viven en áreas endémica (Dengvaxia®, 2015); sin embargo, no ha tenido los resultados esperados, ofreciendo únicamente cerca del 60% de protección, siendo aún menos eficiente para los serotipos 1 y 2.

1.2 El Virus Dengue

El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae*, (que consta de tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*), al género de los *Flavivirus*, cuyo término se deriva del vocablo latino *flavus*, que significa amarillo, en referencia a la ictericia que causa el Virus de la Fiebre Amarilla. Los *Flavivirus* son transmitidos principalmente por artrópodos y abarcan más de 70 tipos distintos de virus, entre los que se encuentran patógenos de gran relevancia humana como el Virus de la encefalitis Japonesa, el Virus del Nilo Occidental, el Virus de la Fiebre Amarilla, el Virus de la encefalitis

transmitida por garrapatas, el Virus de la Hepatitis C, el Virus Zika, entre otros (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). El Virus Dengue es transmitido por los mosquitos hembra del género *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti* y *Aedes Albopictus*. Es un virus de ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 11kb (Fig. 2 A). Existen cuatro serotipos virales antigénicamente distintos pero genéticamente emparentados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, que comparten aproximadamente el 65% de sus genomas pero cada uno genera una respuesta inmune única del hospedero a la infección; no obstante, Normile y colaboradores, en el 2013, reportaron el descubrimiento del quinto serotipo del virus en un muestreo en Malasia en el 2007, DENV-5, cuya secuencia genética es filogenéticamente distinta de los serotipos conocidos, produce una enfermedad leve y principalmente circula entre primates (no en humanos) de manera silvestre (Mustafa *et al.*, 2015).

La partícula viral madura tiene un diámetro aproximado de 500 Å (Fig. 2. B) y consiste en una nucleocápside interna compuesta por una única copia del ARN genómico asociado con aproximadamente 180 copias de la proteína de la cápside (peso molecular de ~12 kDa) y una envoltura o membrana lipídica (obtenida de las células del huésped), sobre la que se encuentran las proteínas de membrana y de envoltura; en el interior se encuentran las proteínas de la cápside y el genoma viral, que codifica una poliproteína ininterrumpida flanqueada por dos regiones no traducidas (UTR's; Kuhn, 2002).

La poliproteína se procesa postraduccionalmente dando lugar a tres proteínas estructurales, la proteína de la cápside (C), la proteína encargada del proceso de maduración de la partícula viral (M) y la proteína de la envoltura (E), y a 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) dentro de las cuales se encuentran las enzimas necesarias para su replicación.

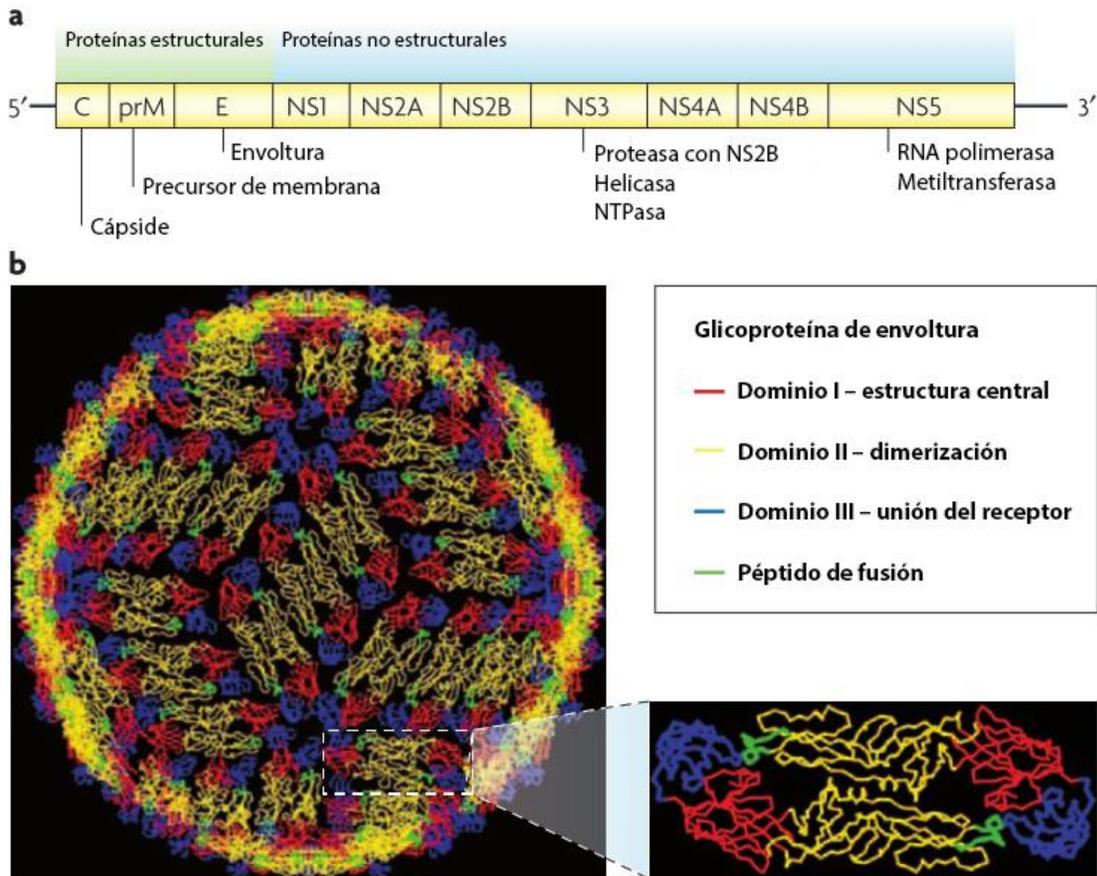


Figura 2. Genoma y partícula del virus Dengue. **a.** El genoma del DENV está formado por una única hebra de ARN de polaridad positiva, éste posee aproximadamente 10,600 nucleótidos, contiene un cap de tipo I en el extremo 5' (m7G5'ppp5'A), pero carece de una secuencia poliadenilada en el extremo 3'. Las regiones no traducidas (UTRs) en los extremos 3' y 5' juegan un papel clave en la regulación de la traducción y en la síntesis del ARN genómico (Clyde and Harris, 2006). La traducción del ARN viral produce un polipéptido que es co-traduccionalmente procesado por proteasas virales y celulares, generando tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales. **b.** El virión del DENV es esférico, es un virus envuelto de aproximadamente 50 nm de diámetro; contiene tres proteínas estructurales (cápside (C), membrana (M) y envoltura (E)) y el ARN genómico. El precursor de membrana, prM, participa en el plegamiento de la glicoproteína E y ambos están integrados en la bicapa lipídica del virión por dos regiones transmembranales que rodean la nucleocápside (Mukhopadhyay *et al.*, 2005 ; Sampey *et al.*, 2014a). En la etapa tardía del ensamblaje del virión en la red trans-Golgi, el precursor de membrana, prM, es cortado por la furina, lo cual resulta en un rearrreglo de las proteínas M y E en la superficie del virión, produciéndose así una partícula infecciosa madura. La superficie del virión maduro del virus Dengue es lisa, con las proteínas de la envoltura alineadas en pares de manera paralela a la superficie del virión (Kuhn, 2002). La glicoproteína E media la unión y fusión celular y también es el principal blanco de los anticuerpos protectores. La glicoproteína E puede ser dividida en tres dominios funcionales o estructurales: el dominio central, el de dimerización que presenta un péptido de fusión y el dominio de unión al receptor. Los viriones entran a la célula por endocitosis mediada por receptor, posteriormente se da la fusión de la membrana viral y celular debido a la proteína E y a las condiciones acídicas dentro del endosoma (Clyde and Harris, 2006; Whitehead *et al.*, 2007).

1.3 Ciclo de replicación del Virus Dengue

El proceso de infección inicia con la unión del virus a la superficie celular: la proteína de envoltura (E) viral se une tanto a receptores y co-receptores celulares aun no bien identificados, permitiendo la internalización del DENV, por endocitosis mediada por receptor (Fig. 3). Se ha reportado que el endosoma tardío se acidifica favoreciendo cambios conformacionales en la proteína E, quedando expuesto el péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana endosomal favoreciendo la trimerización de la proteína E, lo cual es importante para que la envoltura viral se fusione con la membrana del endosoma, liberando así la nucleocápside y el genoma viral (Noisakran *et al.*, 2010). El mensajero se traduce en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso y la poliproteína resultante es procesada postraduccionalmente por proteasas tanto del huésped como virales, dando lugar a las proteínas estructurales y no estructurales. Paralelamente, se lleva a cabo la amplificación del genoma por la ARN polimerasa viral, se ensamblan las proteínas de la nucleocápside con el genoma viral y los viriones inmaduros son transportados del Retículo endoplásmico a la red trans-Golgi para su maduración, en donde una proteasa del huésped corta la proteína prM en la superficie viral dando origen a una partícula madura infecciosa, que se liberará al medio extracelular por secreción (Acosta *et al.*, 2014).

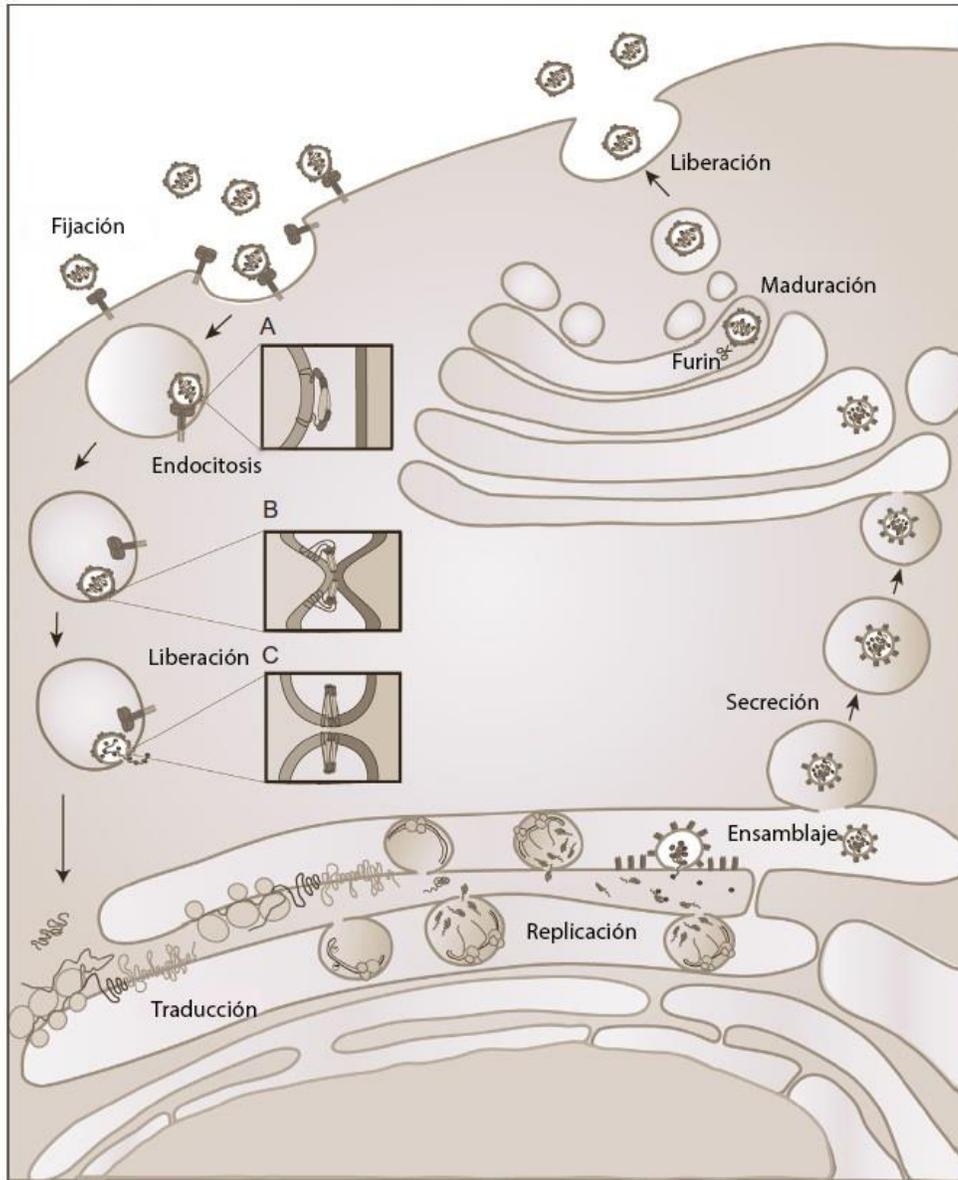


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación del virus Dengue. El virus se une a distintos receptores de la superficie celular y es transportado dentro de la célula por endocitosis mediada por receptor (fijación y endocitosis). La fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma tardío libera la nucleocápside y el ARN viral al citoplasma. Una única poliproteína viral es generada por la traducción del ARN genómico (traducción), que posteriormente es procesada por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). La replicación viral se lleva a cabo por la inducción de las proteínas virales en vesículas derivadas de la membrana del retículo endoplásmico que contienen a la ARN replicasa (replicación). La nucleocápside, compuesta del ARN viral y proteínas de la cápside, se asocia con regiones del retículo endoplásmico ya ricas en las proteínas E y prM y brota hacia el lumen del mismo formando viriones inmaduros (ensamblaje). Los viriones inmaduros son liberados de la célula a través de la ruta secretora de transporte (secreción); la maduración del virus se lleva a cabo en la red Trans-Golgi como resultado del procesamiento proteolítico del precursor de membrana prM por la furina (maduración), y las partículas ya maduras del virus son secretadas al medio extracelular (Acosta *et al.*, 2014).

1.4 Cuadro clínico

El dengue presenta un espectro clínico muy amplio, a menudo con evolución y resultados clínicos impredecibles. En la mayoría de los pacientes se presenta una enfermedad febril auto-limitante con manifestaciones inaparentes o leves; no obstante, una pequeña proporción de ellos progresa a la forma severa de la enfermedad, caracterizada principalmente por aumento en la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella y/o el compromiso grave de órganos (WHO, 2009). El tratamiento de elección es la rehidratación intravenosa para los casos graves; sin embargo, resulta complicado determinar qué pacientes progresan o no a la forma grave de la enfermedad, por lo que en el 2009 la OMS propuso una nueva clasificación de caso utilizando una serie de parámetros clínicos, de laboratorio o ambos, logrando establecer los criterios para el diagnóstico de dengue (con signos de alarma y sin ellos) y dengue grave (Fig. 4).



Figura 4. Clasificación y signos para la identificación del nivel de gravedad en casos de Dengue (WHO, 2009).

El dengue es una enfermedad multifactorial, en la que participan factores tanto individuales (edad, estatus inmunológico, enfermedades crónicas, anticuerpos previos), epidemiológicos (amplia circulación de los cuatro serotipos, presencia de una alta densidad del vector, una población primo-infectada) y virales (serotipo, virulencia de la cepa) que participan en la severidad clínica (WHO, 2012).

En algunos casos, en primo-infección, los pacientes presentan un cuadro febril y dolor generalizado, que se resuelven rápidamente de cuatro a siete días en promedio. Sin embargo, los pacientes que presentan una infección secundaria con un serotipo distinto al que causó la primera infección tienen más posibilidades de desarrollar Dengue Severo (WHO, 2009).

Una vez pasado el periodo prodrómico, la enfermedad progresa de manera abrupta y sigue tres fases: febril, crítica y de recuperación (WHO, 2012).

1.4.1 Fase febril

La fase febril del Dengue, se caracteriza por la presencia de fiebre elevada de manera abrupta, la cual dura de 2 a 7 días y a menudo está acompañada de rubor facial, eritema de la piel, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias y cefalea (Rigau-Pérez, 1998). Algunos pacientes pueden tener dolor de garganta, faringe enrojecida y enrojecimiento conjuntival; también son comunes la anorexia, náuseas y vómito y en ocasiones se pueden observar manifestaciones hemorrágicas leves, como petequias y sangrado de mucosas (por ejemplo, nasal y de las encías). En la primera fase febril temprana, puede ser difícil distinguir clínicamente el Dengue de otras enfermedades febriles exantemáticas (Kalayanarooj *et al.*, 1997; Phuong *et al.*, 2002).

1.4.2 Fase crítica

Inicia una vez que disminuye la fiebre a 37,5°C o 38°C o menos y permanece por debajo de este valor; usualmente en los días 3 a 7 de la enfermedad, se puede presentar un aumento en la permeabilidad capilar junto con valores elevados del hematocrito, así como leucopenia progresiva, seguida de trombocitopenia, previamente al período de extravasación de plasma, que dura generalmente entre 24 y 48 horas (Kalayanarooj *et al.*, 1997; Nimmannitya *et al.*, 1969; Srikiatkachorn *et al.*, 2007). En este momento, los pacientes que no presentan aumento de la permeabilidad capilar mejoran, mientras que los que tienen un incremento de la permeabilidad capilar pueden empeorar como resultado de la extravasación del plasma y pérdida del volumen circulante (pudiendo presentarse derrame pleural y ascitis), favoreciendo la presencia de choque hipovolémico, pudiendo estar indicado por una disminución de la temperatura corporal. Con un choque prolongado, la hipoperfusión que se presenta resulta en deterioro orgánico progresivo (pudiéndose desarrollar hepatitis, encefalitis o miocarditis), acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada. Esto, a su vez, lleva a una hemorragia que hace que el hematocrito disminuya; no obstante, el desarrollo de hemorragia severa se puede presentar de manera independiente al choque, pudiendo progresar a dengue grave (Eric *et al.*, 2008).

1.4.3 Fase de recuperación

En esta fase, si el paciente sobrevive a la fase crítica de 24 a 48 horas, en las siguientes 48 a 72 horas, tendrá lugar la reabsorción gradual de los líquidos del compartimento extravascular. Mejora en forma general, regresa el apetito, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se estabiliza el estado hemodinámico y se presenta diuresis. El hematocrito se estabiliza, el conteo de leucocitos generalmente comienza a subir inmediatamente después de la disminución de la fiebre y generalmente la recuperación del número de plaquetas es posterior al del número de leucocitos. Por otro lado, la insuficiencia respiratoria, producida por el

derrame pleural masivo y la ascitis, así como la insuficiencia cardiaca congestiva, puede ocurrir en cualquier momento si ha habido un remplazo excesivo de líquidos intravenosos (WHO, 2009).

En la Tabla 1 se resumen los distintos problemas clínicos que se pueden presentar durante las distintas fases del Dengue.

1	Fase febril	Deshidratación; la fiebre alta puede causar trastornos neurológicos y convulsiones febriles en niños pequeños.
2	Fase crítica	Choque a causa de la extravasación de plasma; hemorragia importante; deterioro de órganos.
3	Fase de convalecencia	Hipervolemia (sólo si la terapia de líquidos intravenosos ha sido excesiva o se ha extendido a esta fase)

Tabla 1. Fase febril, crítica y de convalecencia o recuperación del Dengue (WHO, 2009).

1.5 Factores de predisposición del Dengue grave

Los factores particulares individuales de riesgo determinan la gravedad de la enfermedad y, aunque la mayoría de los casos graves se asocian a una infección secundaria, se han llegado a reportar algunos casos graves asociados a una infección primaria o a la virulencia de ciertas cepas; que son factores asociados al riesgo de severidad (WHO, 2009).

Los fenotipos severos del dengue son observados no en el momento cuando la carga viral está en su punto más elevado *in vivo*, si no, paradójicamente, cuando el virus se encuentra siendo rápidamente eliminado de los tejidos del huésped por la respuesta inmune innata y adaptativa (Whitehorn and Simmons, 2011). Por lo cual, la patogénesis de las complicaciones clínicas importantes está ligada en gran parte a la respuesta inmune del huésped, así como a factores determinantes de la severidad propios del hospedero, a factores virales y epidemiológicos (Fig. 5).

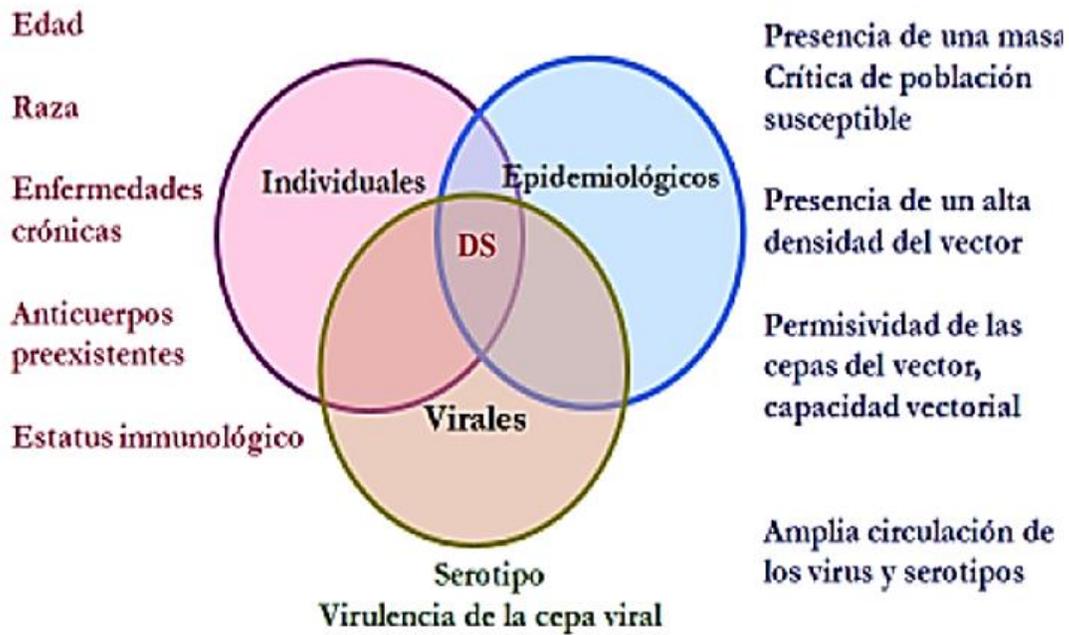


Figura 5. Interacción de factores que determinan el cuadro clínico del Dengue Severo (CDC, 2009).

1.6 Patogénesis del Dengue

El Dengue es una enfermedad multifactorial, en la que la interacción entre los factores del hospedero y virales aún no es del todo comprendida. Se han propuesto distintas hipótesis que intentan explicar las formas severas de la enfermedad, entre las que se encuentra la “Facilitación de la infección” en el curso de una infección secundaria, en la que los anticuerpos (ABs) de reacción cruzada no neutralizantes, que fueron producidos en la infección primaria, se unen al virus, confiriéndole un mayor potencial para infectar a las células portadoras del receptor Fc; a este fenómeno se le conoce como amplificación dependiente de ABs (ADE), ya que potencialmente incrementa el riesgo de desarrollar las formas severas de la enfermedad al incrementar el número de células infectadas por el virus (Guzman and Kouri, 2008; Halstead, 2003; Whitehorn and Simmons, 2011).

El dengue severo está caracterizado por extravasación de plasma, hemoconcentración y alteraciones en la homeostasis; como la trombocitopenia y

coagulopatía. Los mecanismos que conducen a la enfermedad grave no están bien definidos pero, como ya se mencionó, la respuesta inmunitaria, los factores genéticos del individuo y los factores virales (virulencia del serotipo) pueden contribuir al dengue grave (WHO, 2009).

Se sugiere que la activación de las células endoteliales, favorece una producción exacerbada de citocinas pro-inflamatorias predisponiendo a la extravasación del plasma. Asimismo, la activación de los monocitos por DENV y las células T con la producción de mediadores inflamatorios (monocinas, citocinas y receptores solubles), también pueden estar involucrados en la disfunción de las células endoteliales (Appanna *et al.*, 2012; Avirutnan *et al.*, 1998). Particularmente, se correlaciona el nivel de respuesta de las células T con la severidad de la enfermedad; debido a que la expresión de antígenos virales en la superficie de las células infectadas desencadena la proliferación de las células T de memoria y la producción de un incremento de citocinas pro-inflamatorias (como IFN- γ , TNF- α e IL-10), que tienen un efecto indirecto en las células endoteliales vasculares y producen las condiciones adecuadas que modifican la permeabilidad del endotelio vascular, resultando así en la extravasación de plasma, que se asocia al dengue severo (Basu and Chaturvedi, 2008; Pang *et al.*, 2007; Rothman and Ennis, 1999).

La trombocitopenia puede estar asociada con alteraciones en la megacariocitopoyesis causada por la infección de las células hematopoyéticas humanas y con el deterioro del crecimiento de células progenitoras, lo que resulta en disfunción plaquetaria (activación y agregación de plaquetas) y mayor destrucción o consumo (secuestro o consumo periférico). De este modo, la hemorragia puede ser consecuencia de la trombocitopenia y la disfunción plaquetaria asociada o de la coagulación intravascular diseminada. En resumen, ocurre un desequilibrio transitorio y reversible de los mediadores solubles, citocinas y quimiocinas durante el dengue grave, favorecido por una elevada carga viral temprana, lo que conduce a la disfunción de las células endoteliales vasculares, trastorno del sistema de hemocoagulación, y, posteriormente, a la extravasación de plasma, choque hipovolémico y sangrado (WHO, 2009).

Recientemente, se propuso otro marcador biológico directamente asociado a la severidad de la enfermedad por el virus Dengue: niveles elevados de micropartículas (MPs) derivadas de las células rojas, como resultado de la muerte celular por apoptosis y la activación celular; mientras que una disminución significativa en los niveles de MPs derivadas de plaquetas se ha asociado con una tendencia hemorrágica (Punyadee *et al.*, 2015).

Las MPs son un tipo de vesículas extracelulares (EVs) que, de encontrarse en mayor proporción en la circulación, pueden indicar condiciones patológicas, como infecciones agudas o crónicas. Anteriormente, se ha reportado el incremento en el nivel circulante de MPs en diferentes infecciones sistémicas como la sepsis (Nieuwland *et al.*, 2000), la infección por el HIV (Aupeix *et al.*, 1997), malaria (Nantakomol *et al.*, 2011) y Hepatitis crónica activa (Kornek *et al.*, 2011). Las MPs participan durante la fase aguda del Dengue al ser generadas por la vesiculación de muchos tipos celulares, debido a la estimulación celular por el DENV. Éstas presentan en su superficie fosfolípidos cargados negativamente como la fosfatidilserina (PS), que tienen actividad procoagulante y que en grandes cantidades se asocia con estados de hipercoagulación; asimismo, las MPs pueden presentar las proteínas virales NS1 y E, como estrategia probable del DENV para escapar a la respuesta inmune y diseminar la infección (Punyadee *et al.*, 2015). Aunque aún se desconoce el mecanismo molecular por el que se producen las MPs posterior a la infección por el DENV, éstas son un marcador potencial en la predicción del Dengue grave; no obstante, aún se desconoce la posible generación y/o participación de otras poblaciones de vesículas extracelulares, durante la infección por el DENV y su posible implicación en la patogenia del Dengue Severo.

II. ANTECEDENTES

2.1 Vesículas extracelulares

La comunicación intercelular es un distintivo esencial de los organismos multicelulares, necesario para la coordinación y desarrollo de los distintos tipos de células y tejidos, indispensable en procesos celulares tales como la migración celular, proliferación, diferenciación, apoptosis y carcinogénesis. Ésta puede ser mediada a través de la secreción de moléculas, la presencia e interacción con receptores en la superficie celular o del contacto directo célula-célula (Raposo and Stoorvogel, 2013; Turturici *et al.*, 2014). No obstante, actualmente se reconoce que la liberación de partículas rodeadas por una bicapa de fosfolípidos al medio extracelular, denominadas como vesículas extracelulares, es un mecanismo conservado evolutivamente por eucariontes y procariotes de comunicación intercelular, una respuesta celular de adaptación universal (György *et al.*, 2011; van der Pol *et al.*, 2012a). Su importancia radica en la compleja y especializada capacidad de transferir información y de esta manera repercutir en la función celular de la célula receptora, así como en su potencial como biomarcadores al encontrarse en prácticamente todos los fluidos biológicos, incluyendo sangre, orina, saliva, leche materna, líquido amniótico, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, bilis, y semen (Colombo *et al.*, 2014; Yáñez-Mó *et al.*, 2015). A pesar de la heterogeneidad de tamaño y composición, se clasifican de manera general en cuerpos apoptóticos, micropartículas inducidas por activación o apoptosis y exosomas. Los cuerpos apoptóticos son las vesículas extracelulares de mayor tamaño, con un rango de 1 a 5 μm , densidad de 1.16 a 1.28 g/ml y forma heterogénea; expresan en su superficie fosfatidilserina y son liberadas a partir de la membrana plasmática por células activadas o en proceso de apoptosis (György *et al.*, 2011; Mathivanan *et al.*, 2010; Van Der Pol *et al.*, 2012b). Las micropartículas son microvesículas derivadas a partir de la reorganización de la membrana plasmática de una célula estimulada o en apoptosis; es decir, son fragmentos de la membrana celular, al igual que los cuerpos apoptóticos, liberados por un intercambio lipídico de la cara interna hacia la cara

externa de la membrana debido al incremento significativo y sostenido de Ca^{2+} intracelular que produce la pérdida de la simetría membranal y su posterior remodelación para producir las micropartículas; miden de 100 a 1000 nm, por lo que su tamaño es comparable al de las bacterias y complejos inmunes, expresan en su superficie fosfatidilserina y han sido ampliamente caracterizadas como productos de plaquetas, eritrocitos y células endoteliales (Delabranche *et al.*, 2012; György *et al.*, 2011). Los exosomas, por otro lado, se diferencian de las demás vesículas extracelulares por peculiaridades en su tamaño (comparable al de los virus), composición (marcadores membranales y contenido específicos) y biogénesis (son las únicas vesículas extracelulares generadas en un organelo celular); aunado a que son las microvesículas más estudiadas en el contexto del proceso infeccioso e inmunológico.

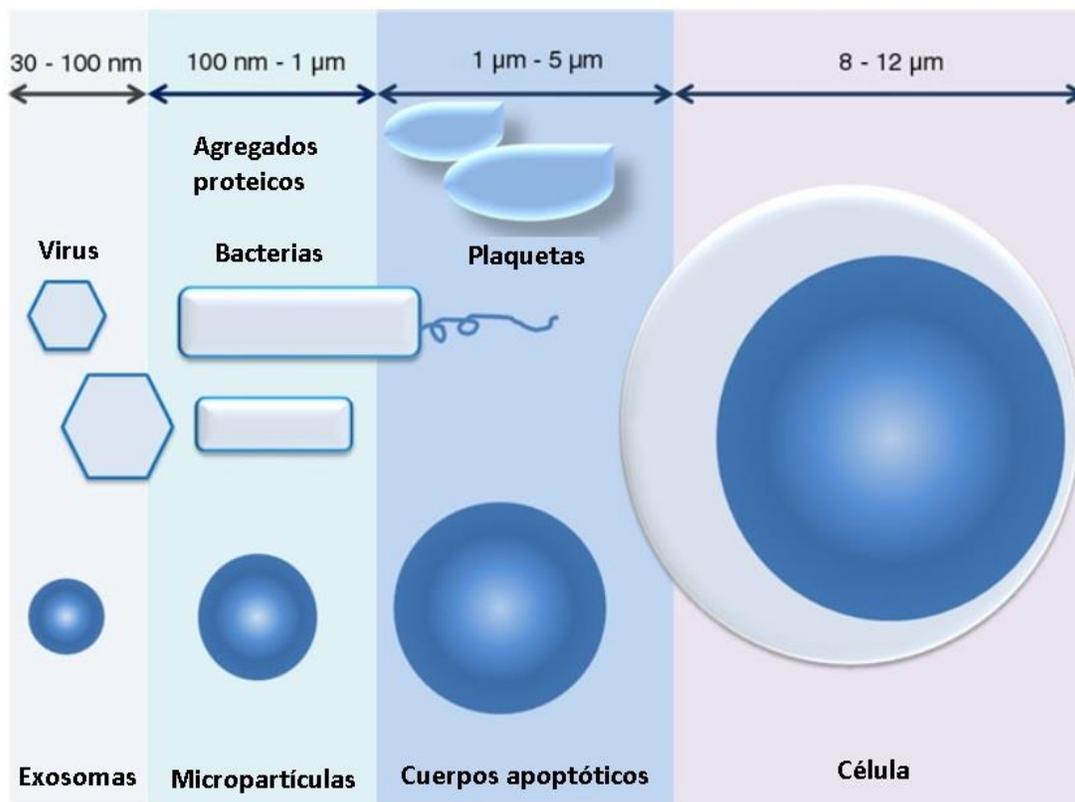


Figura 5. Rangos de tamaño de los principales tipos de vesículas extracelulares: los exosomas comparten distribución de tamaño con distintos virus (de 30 a 100-120 nm), las micropartículas o microvesículas se asemejan en tamaño a algunas bacterias y agregados proteicos, por ejemplo complejos inmunes (de 100 nm a 1 micra) y los cuerpos apoptóticos y las plaquetas caen en el rango de tamaño de 1 a 5 micras (György *et al.*, 2011; Konadu *et al.*, 2016) .

2.2 Exosomas

Los exosomas fueron descritos por primera vez por Harding y colaboradores en 1983; en cuyo estudio describían la presencia del receptor de transferrina enriquecido dentro de vesículas presentes en endosomas multivesiculados no lisosomales y la posterior fusión de éstos con la membrana plasmática para liberar las vesículas internas mediante exocitosis (Harding *et al.*, 1983). Posteriormente, el término “exosoma” fue acuñado por Johnstone y colaboradores en 1987 para referirse a estas vesículas liberadas al medio extracelular (Johnstone *et al.*, 1987). Los exosomas actualmente se definen como pequeñas vesículas de membrana liberadas por la mayoría de tipos celulares, como consecuencia de la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Son mediadores de la comunicación intercelular y están involucrados tanto en procesos fisiológicos como en condiciones patológicas; miden aproximadamente de 30-120 nm, por lo que su tamaño es similar al de los virus. Los exosomas son liberados de manera constitutiva así como por inducción y se encuentran en todos los fluidos corporales, tales como plasma sanguíneo, orina, saliva, leche materna, líquido de lavado bronquial, cerebral, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico y ascitis; de ahí su potencial como biomarcadores de enfermedades (Gangoda *et al.*, 2014; Ludwig and Giebel, 2012). Sus métodos de aislamiento y análisis incluyen la centrifugación diferencial seguido de la ultracentrifugación de un gradiente de sacarosa o Iodixanol (OptiPrep™), así como inmunoaislamiento, microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés), análisis por rastreo de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés), citometría de flujo, western blot y espectrometría de masas.

2.3 Formación de los exosomas

La ruta endocítica celular es una red de compartimentos membranales altamente dinámica, que permite la internalización de ligandos extracelulares, o componentes celulares como proteínas membranales y lípidos, mediante endocitosis, ya sea para

su reciclaje hacia la membrana plasmática, secreción o degradación. Independientemente de la ruta de entrada celular, las moléculas internalizadas tienen como destino el endosoma temprano; de esta manera la célula tiene la posibilidad de clasificar, procesar, reciclar, almacenar, activar, silenciar y degradar los solutos, receptores o agentes patógenos entrantes y regular diferentes vías celulares. El material internalizado, ya en el endosoma temprano, puede seguir posteriormente tres rutas: la de degradación, reciclaje o secreción. En caso de ser clasificado para su degradación, el endosoma temprano madurará a un cuerpo multivesiculado (MVB, por sus siglas en inglés) que se fusionará con los lisosomas, que son compartimentos acidificados por enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar macromoléculas. El proceso de reciclaje es mediado por el endosoma temprano y calcio puede ser lento o rápido, dependiendo del tiempo de internalización y re-exposición de la biomolécula en la superficie celular. Por último, la secreción involucra la maduración del endosoma temprano en endosoma tardío, que posteriormente se denominará como cuerpo multivesiculado mediante la formación de vesículas intraluminales; éste MVB se fusionará con la membrana celular y liberará las vesículas de su interior hacia el espacio extracelular; es decir, los exosomas (Alenquer and Amorim, 2015; Colombo *et al.*, 2014; Huotari and Helenius, 2011).

Los exosomas, por tanto, se forman a partir de la invaginación de la membrana limitante del endosoma tardío hacia el lumen de éste, formando así los MVBs que contienen a los exosomas, denominados en este punto como vesículas intraluminales (ILVs por sus siglas en inglés), ya que el término “exosoma” se aplica una vez que éstas son liberadas al medio extracelular. La formación de las vesículas intraluminales se lleva a cabo mediante mecanismos dependientes o independientes de la maquinaria del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés; Robbins and Morelli, 2014). Hasta la fecha, no se ha descrito una única ruta de biogénesis de exosomas, se propone que dependa del tipo celular y del contenido que será dirigido hacia las ILVs; resultando así en un contenido, tamaño, composición membranal altamente

heterogéneos y dinámicos, que dependen de las condiciones de la célula de origen, su estado y las condiciones ambientales (Yáñez-Mó *et al.*, 2015; Fig. 6).

2.3.1 Formación de las vesículas intraluminales en los MVBs dependiente de ESCRT

El proceso de generación de exosomas, dependiente del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte, requiere que las proteínas y lípidos (contenido exosomal) sean dirigidos hacia la membrana endosomal, que sean entregados en las vesículas intraluminales en proceso de formación y que éstas sean posteriormente escindidas hacia el lumen del endosoma. El marcaje de las moléculas que conformarán al exosoma se da por monoubiquitinación (señal de direccionamiento de las proteínas hacia las vesículas intraluminales), de los dominios citosólicos de las proteínas transmembranales que han sido internalizadas de la superficie celular o a través de la red Trans-Golgi (Robbins and Morelli, 2014). No obstante, cabe mencionar que no todas las proteínas requieren ubiquitinación para su clasificación endosomal, tal es el caso de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II; Gauvreau *et al.*, 2009).

Las proteínas ya ubiquitinadas son capturadas por la maquinaria ESCRT; el cual está compuesto aproximadamente por 20 proteínas agrupadas en cuatro complejos (ESCRT-0, -I, -II y -III) y diversos componentes accesorios, como las proteínas VPS4, VTA1, and ALIX (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Hurley and Hanson, 2010; Raiborg and Stenmark, 2009). El complejo ESCRT-0, formado por Hrs, STAM1 y STAM2, se une a dominios de unión de clatrina, regiones enriquecidas en fosfatidilinositol 3-fosfato y ubiquitina en el lado citosólico del endosoma, reconociendo, capturando y clasificando así a las proteínas ubiquitinadas que serán direccionadas hacia las vesículas intraluminales; posteriormente, se recluta al complejo ESCRT-I, conformado por TSG101, Vps37 A-D, Vps28, MVB12A MVBB, que se une tanto a

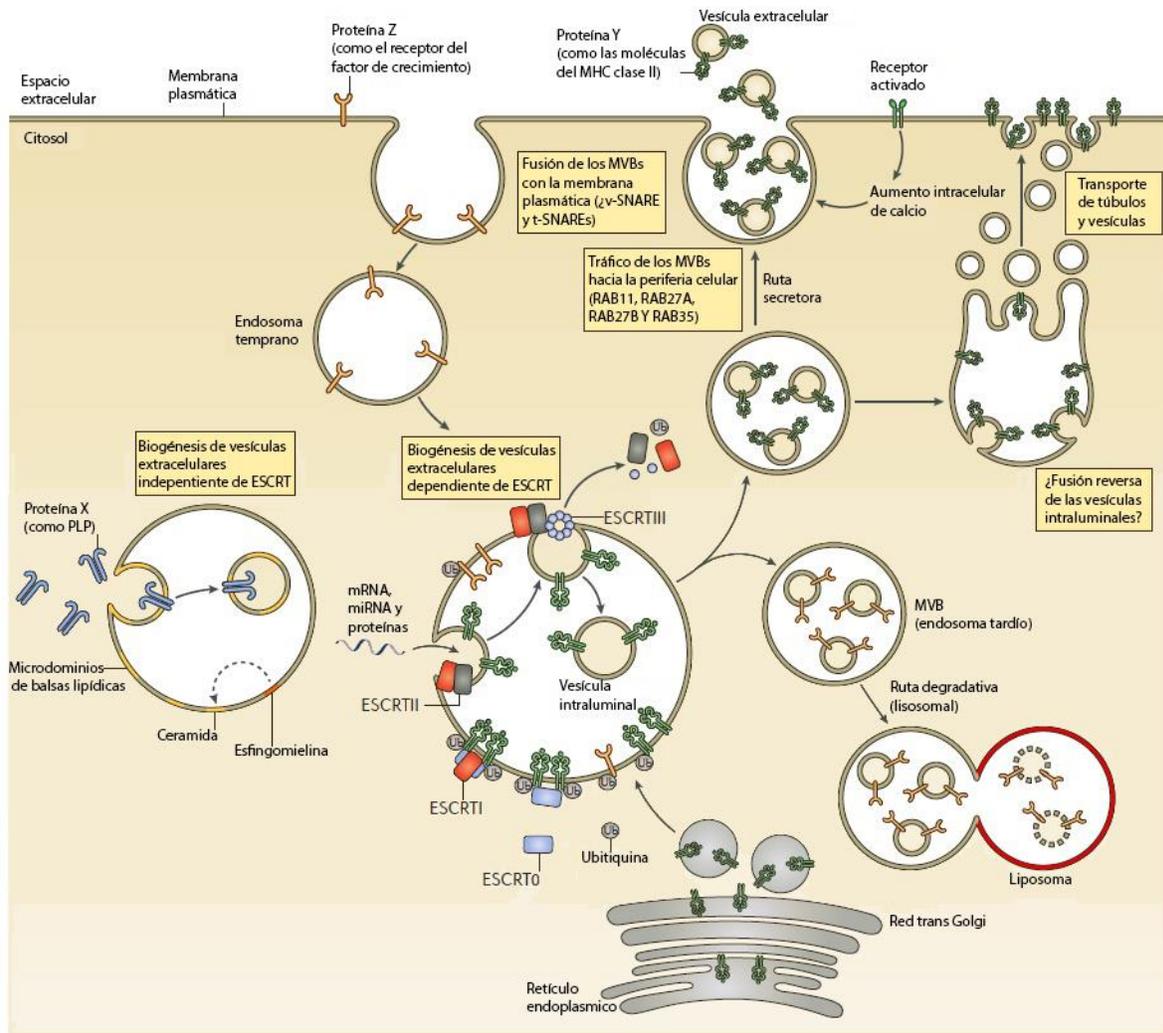


Figura 6. Biogénesis de las vesículas extracelulares (exosomas). Las vesículas extracelulares son generadas como vesículas intraluminales (ILVs) por mecanismos dependientes o independientes de la maquinaria del complejo de clasificación requerido para el transporte (ESCRT). Las proteínas que son transportadas desde Golgi (por ejemplo las moléculas del MHC clase II) o que son internalizadas desde la superficie celular (por ejemplo, los receptores del factor de crecimiento activados) son ubiquitinadas en su dominio citosólico. No obstante, proteínas tales como las moléculas del MHC clase II no requieren ubiquitinación para su transporte a vesículas. El complejo ESCRT-0 reconoce a las proteínas ubiquitinadas del lado citosólico del endosoma o de la membrana del MVB, las segrega en microdominios y une al complejo ESCRT-I, que en cambio recluta las subunidades de ESCRT-II. ESCRT-I y ESCRT-II inician la invaginación de las nacientes ILVs dentro de los MVBs. Posteriormente, ARNs citosólicos y diversas proteínas tienen acceso al interior de las vesículas en formación, así como el complejo ESCRT-II recluta las subunidades de ESCRT-III dentro del cuello de las nacientes ILVs, que resulta en la escisión de las vesículas libres. Las moléculas libres de ubiquitina y las subunidades ESCRT son liberadas al citosol para su reciclaje. Algunas proteínas (como la proteína proteolípida, PLP) son traficadas hacia las ILVs independientemente de la maquinaria ESCRT a través de microdominios de balsas lipídicas ricos en esfingolípidos, a partir de los cuales se forma la ceramida por medio de esfingomielinasas. La ceramida induce la coalescencia de los microdominios y desencadena la formación de las ILVs. La línea punteada indica que el papel de la ceramida en la formación de las ILVs es aún controversial. Una vez formados, los MVBs pueden seguir la ruta secretora o degradativa. En la ruta secretora, los MVBs son transportados a la periferia celular y se fusionan con la membrana plasmática, liberando a las ILVs (ahora denominadas exosomas). En la ruta degradativa, los MVBs liberan las ILVs en los lisosomas. La ruta lisosomal es crucial para limitar la señalización de receptores activados del factor de crecimiento. Probablemente las diferencias en los MVBs determinan su ruta de tráfico (Robbins and Morelli, 2014; Sampey

ESCRT-0 como a las proteínas ubiquitinadas que formarán parte del contenido exosomal, sugiriéndose que funciona como un sistema adicional de clasificación del transporte de biomoléculas. ESCRT-I a su vez se une a ESCRT-II (Vps22, Vps25 y Vps36), lo cual inicia la invaginación o brote en reversa de las ILVs hacia el lumen del MVB, la captura del contenido exosomal y el reclutamiento de ESCRT-III, que se conforma por las subunidades Vps2A, Vps2B, Vps24, Snf7A, SNFB, SNFC, Vps20, Alix; un subconjunto de las cuales se oligomerizan dentro del cuello de las ILVs, concluyendo la captura de la carga exosomal, deformando la membrana y escindiendo las vesículas (Babst, 2011; Colombo *et al.*, 2013; Hurley and Hanson, 2010; Iraci *et al.*, 2016).

Mediante el silenciamiento génico concomitante de diversas subunidades de la maquinaria ESCRT se ha podido observar una disminución poco clara en la secreción de exomas, más no la inhibición total, estableciéndose así que otros mecanismos aparte de la maquinaria ESCRT están involucrados en la producción de exomas (Villarroya-Beltri *et al.*, 2014).

2.3.2 Formación de las vesículas intraluminales en los MVBs independiente de ESCRT

Se ha observado que los lípidos también están involucrados en la secreción de exomas y en la clasificación del contenido exosomal. Uno de estos mecanismos requiere la esfingomielinasa de tipo II, que hidroliza la esfingomielina a ceramida (Trajkovic *et al.*, 2008); lo cual se observó a partir de la disminución notoria en la formación y liberación de exomas (positivos para proteolípidos) al silenciar la expresión de la esfingomielinasa neutral con ARN pequeño de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) o al inhibir su actividad con el fármaco SW4869 (Colombo *et al.*, 2013; Trajkovic *et al.*, 2008). Esta ruta alternativa es dependiente de microdominios enriquecidos en balsas lipídicas de colesterol que dirigen la segregación lateral del contenido exosomal dentro de la membrana endosomal; contienen altos niveles de esfingolípidos, a partir de los cuales se forma la ceramida.

Este lípido induce la coalescencia de pequeños microdominios con el objetivo de formar dominios más grandes promoviendo así la formación e invaginación de la incipiente vesícula mediada por dominios. Posiblemente esto se deba a la estructura cónica de la ceramida, que induce una curvatura negativa natural, creando un área media distinta en las caras de la membrana, aunado a que se le asocia a la población de ILVs que tienen un destino secretorio como exosomas en vez de lisosomal (Trajkovic *et al.*, 2008).

2.3.3 Formación de las vesículas intraluminales en los MVBs mediada por tetraspaninas

Las tetraspaninas son una superfamilia de proteínas integrales de membrana con cuatro dominios transmembranales típicamente enriquecidas en los exosomas; están implicadas en diversos procesos biológicos, como adhesión celular, motilidad, invasión, fusión de membranas, señalización y tráfico de proteínas (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Iraci *et al.*, 2016). A través de su interacción con otras proteínas transmembranales, proteínas de señalización citosólicas y lípidos y mediante cinco regiones críticas en las tetraspaninas, poseen la habilidad de organizar las membranas lateralmente formando microdominios enriquecidos en tetraspaninas (TEMs, por sus siglas en inglés; Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Hemler, 2008). De hecho, cerca de la mitad de la composición proteica de los exosomas corresponde al interactoma de tetraspaninas, lo que sugiere que los TEMs juegan un papel regulador en la estructura de los mismos al participar activamente en la elección del selecto grupo de receptores de exosomas (Perez-Hernandez *et al.*, 2013). Entre las tetraspaninas más distribuidas en tejidos, encontradas en membranas endocíticas y utilizadas ampliamente como marcadores exosomales están CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151 (Berditchevski and Odintsova, 2007). De esta manera, los TEMs poseen un papel importante en la modulación de la internalización, reciclaje y clasificación de las proteínas que formarán los exosomas. Particularmente se ha visto que la tetraspanina CD81 es responsable del transporte de la proteína Wnt11 en exosomas, que contribuye a la migración celular y a la metástasis de células de

cáncer de mama (Luga *et al.*, 2012); por otro lado, la carga de la metaloproteínasa CD10 en los exosomas, que está involucrada en la maduración de las células pre-B y la migración de las células B a la circulación sanguínea, así como de la metaloproteínasa ADAM17, una convertasa de TNF- α , es dependiente de la tetraspanina CD9 (Gutiérrez-López *et al.*, 2011; Mazurov *et al.*, 2013). De igual manera, se ha reportado que la tetraspanina CD63 está implicada en la biogénesis de los exosomas al regular el transporte y asociarse a componentes clave de los TEMs como la sintenina-1, proteína que está implicada en el tráfico de proteínas transmembranales (Latysheva *et al.*, 2006); así como en la carga de la proteína PMEL, componente relacionado a la biogénesis de organelos relacionados a lisosomas, durante la melanogénesis (van Niel *et al.*, 2011) y de la oncoproteína viral LMP1 del virus Epstein-Barr en los exosomas (Verweij *et al.*, 2011).

Una vez formados los MVBs, se propone que su composición los separe en dos poblaciones, una rica en TEMs, lípidos asociados (como el colesterol, la esfingomielina y el gangliósido GM3) y con concentraciones bajas de ácido lisobifosfatídico que seguirá la ruta secretora, y la otra que se caracteriza por concentración baja en colesterol y alta en ácido lisobifosfatídico que seguirá la ruta lisosomal (Buschow *et al.*, 2009). Aquellos MVBs que tengan destino secretorio serán dirigidos a la periferia celular para que se fusionen con la membrana plasmática y liberen las ILVs (denominadas como “exosomas” una vez que se encuentran en el medio extracelular); dicho proceso requiere la acción coordinada del citoesqueleto y la maquinaria de fusión vesicular, mediada por la familia de hasta 60 miembros de proteínas RAB, que son pequeñas GTPasas encargadas del tráfico vesicular; por lo tanto, se encuentran enriquecidas en los diversos compartimentos de la ruta endocítica (Chavrier *et al.*, 1990; Robbins and Morelli, 2014). Se ha descrito la implicación de la proteína RAB27A en el acoplamiento y fusión de los MBVs con la membrana celular, mientras que RAB27B participa en la transferencia de vesículas del aparato de Golgi al MVB y en su movilización a la corteza rica en actina bajo la membrana plasmática (Ostrowski *et al.*, 2010). Asimismo, se ha visto en la línea celular K562, de eritroleucemia humana, que RAB11 promueve la fusión de los MVBs con la membrana celular en respuesta a un aumento intracelular de

calcio (Savina *et al.*, 2005); mientras que para RAB35 se ha reportado un papel importante en el acoplamiento e inmovilización de vesículas a la superficie de células oligodrogiales, viéndose afectada la secreción de exosomas en caso de que esta GTPasa sea inhibida (Hsu *et al.*, 2010).

Posterior al tráfico vesicular, en la fusión de los MVBs con la membrana plasmática se plantea también la participación de factores de acoplamiento y de los receptores SNAP (proteínas receptoras del factor soluble de anclaje, sensible a N-etilmaleimida, SNARE, por sus siglas en inglés), que son una superfamilia de proteínas encargadas de mediar la especificidad (dirección) de tráfico y fusión vesicular con la membrana de objetivo. La fusión se lleva a cabo apareando la proteína SNARE presente en la vesícula de transporte (v-SNARE) con la proteína de unión afín presente en la membrana blanco (t-SNARE; Cai *et al.*, 2007; Rothman, 1994).

2.4 Composición de los exosomas y función biológica

La composición molecular de los exosomas es extensa y diversa; se componen tanto de proteínas ubicuas como específicas de la célula de origen, asumiéndose que las primeras están involucradas en la biogénesis de los mismos y las segundas en su función (Fig. 7). Se ha reportado que no sólo tienen distintas proteínas, sino también ácidos nucleicos tales como ADN, ARN mensajero, micro ARN, ARN de transferencia, ARN ribosomal, ARN no codificante (Corrado *et al.*, 2013; Théry *et al.*, 2002; Valadi *et al.*, 2007) y diversos lípidos (como ceramida, esfingomiélin, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, liso-fosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y colesterol) característicos de la células de origen (Vlassov *et al.*, 2012). A la fecha ya hay diversos estudios proteómicos de exosomas liberados por células de cultivos primarios, líneas celulares, cultivos de tejidos o exosomas aislados de biofluidos, que han permitido la construcción de extensos catálogos de su abundancia proteica y que han sido publicados en línea en bases de datos que agrupan los distintos componentes asociados a exosomas, como Vesiclepedia

(www.microvesicles.org), EVpedia (www.evpedia.info) y ExoCarta (www.exocarta.org; Yáñez-Mó *et al.*, 2015), donde se encuentra incluso una lista de las 100 proteínas más comunes encontradas en los exosomas y el número de veces que han sido identificadas. Entre el contenido inherente a los exosomas se encuentran diversos marcadores, así como proteínas, modificaciones proteicas y modificaciones proteicas post-traduccionales que reflejan de manera específica la localización de la vesícula, su origen celular y mecanismo de secreción (Gonzales *et al.*, 2009; Jeppesen *et al.*, 2014; Østergaard *et al.*, 2012). Generalmente son abundantes en proteínas de membrana plasmática, de citoesqueleto, citosólicas, de choque térmico, así como de proteínas involucradas en el tráfico vesicular. Entre las proteínas citosólicas comúnmente encontradas se encuentran las RABs, pequeñas GTPasas implicadas en la formación de exosomas; habiéndose identificado más de 40 distintas proteínas RABs en diversos estudios (Stenmark, 2009). Las tetraspaninas son a menudo usadas como marcadores exosomales, particularmente CD9, CD63, CD81 y CD82, así como las proteínas 14-3-3, moléculas del MHC, proteínas específicas de estrés (proteínas de choque térmico, HSPs, por sus siglas en inglés como HSP60, HSP70, HSPA5, CCT2 y HSP90), Tsg101 y la proteína Alix de unión a ESCRT (Mathivanan *et al.*, 2010; Witwer *et al.*, 2013). Asimismo, los exosomas poseen diversas Anexinas (anexinas I, II, IV, V, VI, VII y X1), que ayudan en el tráfico de membranas y eventos de fusión (Futter and White, 2007), así como otras proteínas exosomales que incluyen enzimas metabólicas (GAPDH, enolasa 1, aldolasa 1, PKM2, PGK1, PDIA3, GSTP1, DPP4, AHCY, TPL1, peroxiredoxinas, P4HB, LDH, ciclofilina A, FASN, MDH1 y CNP), proteínas ribosomales como RPS3, transmembranales como PIGR, LAMP1 and CD59, de transducción de señales (sintenina, 14-3-3, proteínas G, ARF1, CDC42, estomatina, SLC9A3R1, RALA, PDCD6, rack1, mucina 1, EHD1, RAN, PEBP1, MIF, RRAS2, RAC1, NRAS y EHD4), de adhesión (MFGE8 e integrinas), ATPasas (VCP, ATP1A1, DYNC1H1, ATP5B y ACLY), de citoesqueleto (actinas, tubulinas, cofilina 1, ezrina, profilina 1, moesina, radixina, miosina, perlecan, THBS1, IQGAP1,

queratinas, gelsolina, fibronectina 1 y LGALS3BP), así como moléculas de ubiquitina B y C (Mathivanan *et al.*, 2010).

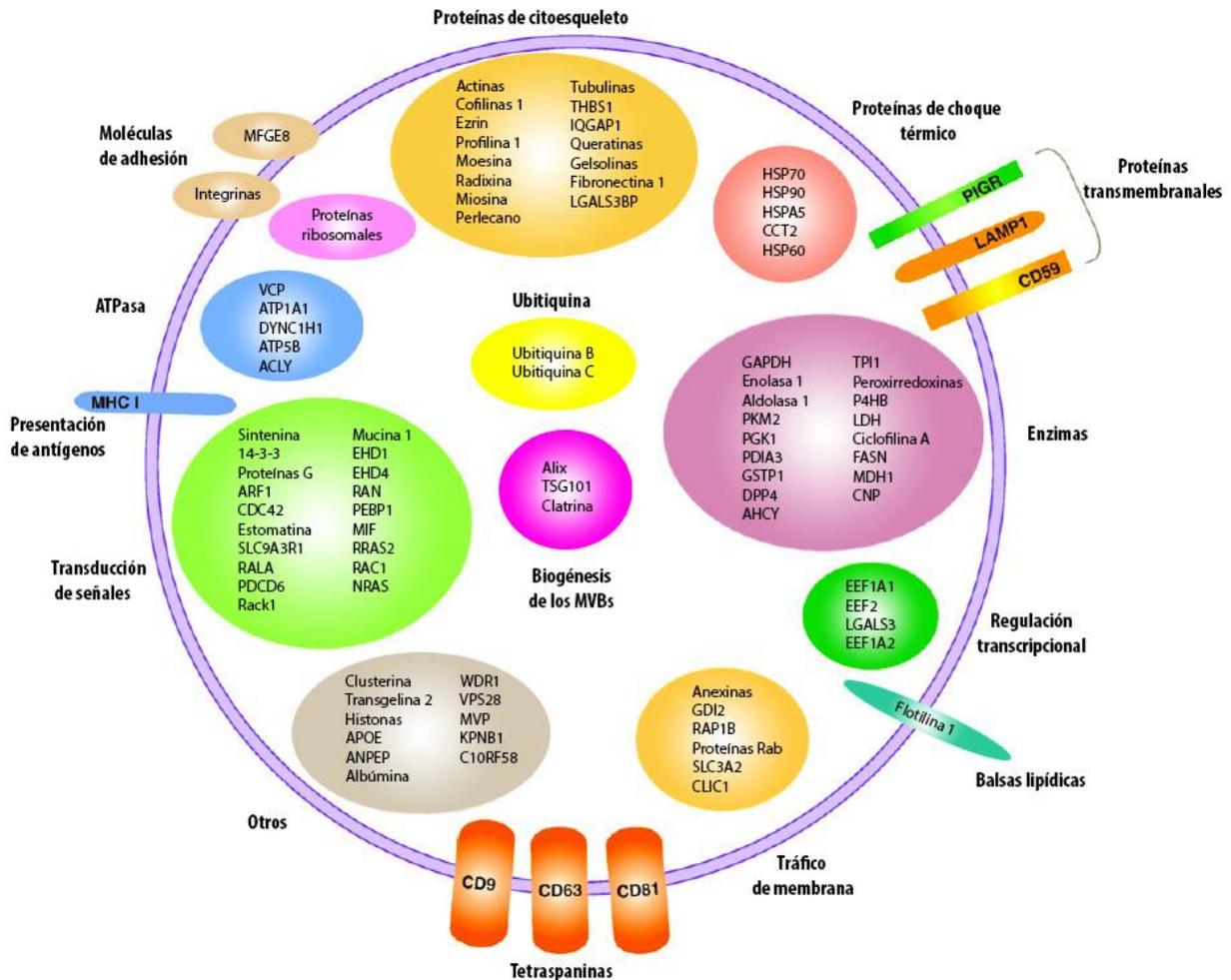


Figura 7. Representación gráfica de la composición proteica de un exosoma típico, categorizada por su función, basada en 19 estudios proteómicos (Mathivanan *et al.*, 2010).

Diversos estudios que han empleado espectrometría de masas identifican componentes exosomales constantes que ya han sido mencionados; no obstante, más de 4400 distintas proteínas ya han sido descritas y el número sigue en aumento. Los exosomas, a su vez, cuentan con un patrón de glicosilación variable en cuanto a condiciones patológicas y la célula de origen, importante por su implicación en la captación de los exosomas por la célula receptora, que se ha visto que depende de proteoglicanos de heparán sulfato en células cancerosas (Christianson *et al.*, 2013); sin embargo, las moléculas implicadas en este paso

dependen igualmente de las diferencias específicas de las células, condiciones de secreción y posterior captación por la célula blanco (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

Al poseer un contenido diverso y variable dependiendo de las condiciones de origen y externas, los exosomas cumplen incontables funciones; ya sea favoreciendo o afectando el contexto fisiológico en que se encuentran. Una vez en el medio extracelular, éstos pueden ejercer su función al interactuar con la célula receptora mediante endocitosis, fagocitosis, fusión e interacción ligando-receptor, de manera autocrina o paracrina, ya sea local o a larga distancia. Entre las funciones más destacadas se encuentran la señalización intercelular: los exosomas pueden modular el crecimiento y desarrollo celular, así como al sistema inmune, induciendo supresión o activación del mismo. Se ha visto que inducen apoptosis de las células T citotóxicas, diferenciación de las células T-cooperadoras a T-reguladoras, regulan la proliferación de las células NK, presentan antígenos específicos afectando la respuesta inmune a varios niveles, juegan un papel en la defensa del hospedero, promueven la diferenciación de monocitos a células mieloides supresoras derivadas, la activación de macrófagos para que secreten factores angiogénicos,

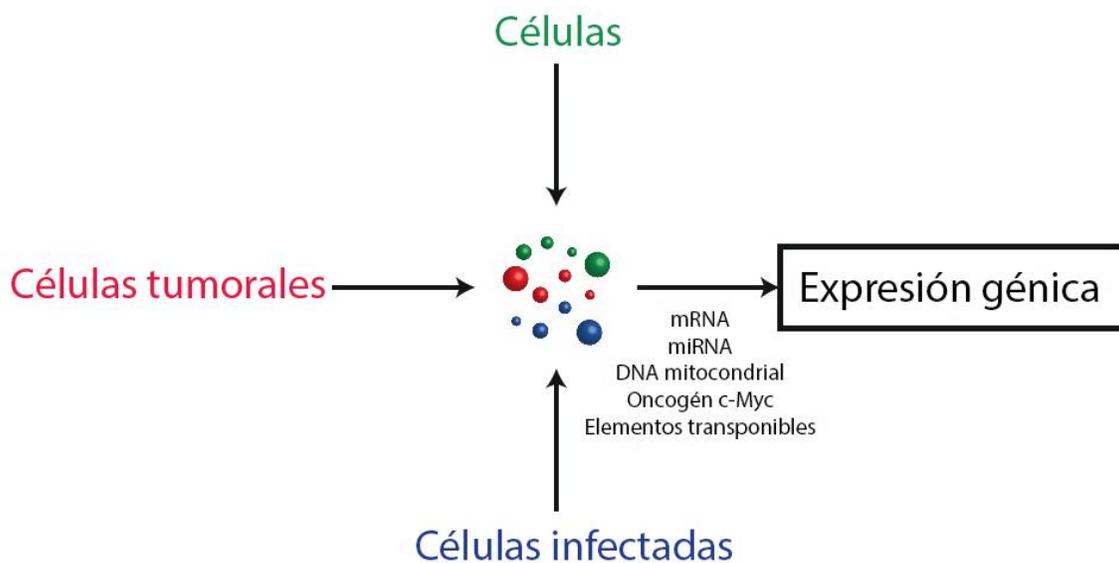


Figura 8. Información genética transferida por vesículas extracelulares. Las células normales, transformadas e infectadas liberan exosomas que contienen información genética que puede ser transferida a las células receptoras, teniendo un efecto a nivel de su expresión génica (Sampev *et al.*, 2014b; van der Pol *et al.*, 2012a).

etcétera (van der Pol *et al.*, 2012a; Yoon *et al.*, 2014). De igual manera, es notable su papel en la transferencia de componentes de señalización, transportando proteínas involucradas en las rutas de señalización Wnt- β catenina (Chairoungdua *et al.*, 2010) y de señalización apoptótica (Khan *et al.*, 2011); en la inflamación, al transferir mediadores de la inflamación como la interleucina 1 β de manera no canónica (Qu *et al.*, 2007) que, junto con otros componentes del inflamosoma, es responsable de la activación de las células endoteliales; en el crecimiento de tumores, metástasis, angiogénesis; adhesión celular (los exosomas de las células B median el anclaje de la matriz celular endotelial; Clayton *et al.*, 2004), eliminación de residuos y protección contra el estrés, una probable implicación en la coagulación y finalmente en la transferencia de morfógenos, información genética, priones y virus (Fig. 8; van der Pol *et al.*, 2012a).

2.5 Exosomas en enfermedades infecciosas

Entre las múltiples moléculas que transportan las vesículas extracelulares y el papel que juegan en el contexto fisiológico o patológico, los exosomas son las microvesículas más estudiadas en enfermedades infecciosas. Se ha visto que son secretados por diversos patógenos microbianos, como las bacterias gram-negativo, protistas del grupo kinetoplastea, hongos oportunistas de los linajes ascomicetos y basidiomicetos y, a su vez, generados por las células de mamífero como resultado de una infección por bacterias, priones o virus; de modo que su liberación, en microambientes específicos, contribuye a la patogénesis, probablemente por un mecanismo general de los patógenos en el que emplean a los exosomas con el fin de entregar diversas moléculas efectoras (componentes derivados de patógenos) al citosol de la célula hospedera (Tabla 2; Schorey *et al.*, 2015; Silverman and Reiner, 2011).

Particularmente, la secreción de exosomas ha llamado la atención en el contexto de las infecciones virales, debido a la similitud y convergencia entre las rutas de entrada y biogénesis viral con la de producción de exosomas, de modo que diversos

virus, tanto DNA como RNA, alteran la composición de las proteínas del hospedero e incorporan proteínas del mismo virus, así como otras moléculas, en los exosomas que serán secretados. Se propone que cierto grado de “entrecruzamiento” o “secuestro” mediado por el virus, a distintos niveles de la biogénesis exosomal, podría ser el responsable de la clasificación de las proteínas virales, u otros componentes, en los exosomas (Schorey *et al.*, 2015). Como se sabe, diversos virus envueltos ARN y ADN deben ser endocitados para que la infección se establezca, siendo posteriormente transportados por membranas endosomales donde ocurre la fusión por acidificación del pH para que se libere la nucleocápside al citosol. Dicho proceso fue puesto en duda por el virus de la estomatitis vesicular (VSV), donde la

Tabla 2. Componentes de diversos patógenos presentes en los exosomas liberados por las células infectadas (Schorey *et al.*, 2015).

Componentes de patógenos presentes en los exosomas/vesículas extracelulares liberados por células infectadas

Patógeno	Contenido de la vesícula	Patógeno	Contenido de la vesícula
HIV	Proteínas Gag	<i>Plasmodium yoelii</i>	Análisis proteómico
	Proteínas Nef		
	Transcritos TAR	<i>Plasmodium falciparum</i>	EBA-175, EBA-181
EBV	RNAs virales		Análisis proteómico
	LMP1		PfPPT2
	LMP2a	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	LAM, PIM
CMV	Glicoproteína B		Lipoproteína de 19 kDa
Hepatitis C virus	RNAs virales		Análisis proteómico
	RNA viral/proteínas		mRNA
	Glicoproteína de Envoltura E2	<i>Mycobacterium avium</i>	GPLs
HSV	Proteínas de tegumento viral y varias glicoproteínas	<i>Salmonella typhimurium</i>	LPS
<i>Toxoplasma gondii</i>	PAMPs	<i>Mycoplasma</i>	Factor letal
<i>Leishmania mexicana</i>	GP63		Análisis proteómico
	Análisis proteómico		
<i>Leishmania major</i>	GP63		
<i>Leishmania donovani</i>	GP63		
	Análisis proteómico		

fusión de la envoltura viral ocurre en las ILVs de los endosomas tempranos/intermedios, liberando la nucleocápside no al citosol, sino dentro del lumen de membranas endosomales donde puede o no permanecer escondido. El VSV fue el primer virus conocido en utilizar las ILVs como vehículos de transporte (Le Blanc *et al.*, 2005), donde posteriormente estas vesículas se fusionan con la membrana limitante del endosoma tardío para liberar la nucleocápside al citosol; un proceso conocido como “fusión-reversa” que es dependiente de Hrs, un componente del complejo ESCRT-0 y de la proteína accesoria Alix (Bache *et al.*, 2003). Otros patógenos, como *Bacillus anthracis*, emplean el mismo mecanismo de fusión reversa en ILVs para entregar su toxina letal al citoplasma, así como algunos miembros del género *Flavivirus*, como el virus Dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la Hepatitis C (HCV; Nour *et al.*, 2013; Nour and Modis, 2014).

Asimismo, ya se ha visto que importantes patógenos humanos tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus del Ébola, el virus de la rabia, y el virus del herpes simple tipo 1 (HSV1), tienen estrategias bien caracterizadas de secuestrar miembros de la ruta ESCRT, que, como se sabe, es el mecanismo más caracterizado de biogénesis de vesículas intraluminales (ILVs; Pawliczek and Crump, 2009; Votteler and Sundquist, 2013). Por otro lado, el virus de la Influenza A, el virus Sendai, el virus sincicial respiratorio, el Bunyavirus y el virus Andes, que comparten un genoma negativo de ARN e infectan el epitelio pulmonar, usan la vía Rab11 en su ciclo infeccioso (Bruce *et al.*, 2010; Rowe *et al.*, 2008; Savina *et al.*, 2002; Utley *et al.*, 2008); mientras que el citomegalovirus (HCMV) hace uso de la GTPasa Rab27a, al igual que el HIV (Fraile-Ramos *et al.*, 2010; Gerber *et al.*, 2015). Para HCV, se ha visto que el componente Hrs del complejo ESCRT es crítico para la liberación de su nucleocápside (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013) y para el virus de la Hepatitis A, lo son las proteínas VPS4B del complejo ESCRT y la proteína accesoria Alix (Chahar *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2013).

Los exosomas derivados de células infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) han sido ampliamente estudiados, debido a que comparten diversas propiedades estructurales y moleculares; físicamente se encuentran en el rango de

tamaño de los 50 a 150nm de diámetro (Conde-Vancells *et al.*, 2008), poseen una densidad de 1.13 a 1.21g/mL (Thery *et al.*, 2001) y 1.16 a 1.18g/mL respectivamente, y están rodeados por una bicapa lipídica. Aparte de la similitud morfológica, su composición también es similar: comparten lípidos como el colesterol y los esfingolípidos (Wubbolts *et al.*, 2003), carbohidratos como la manosa y complejos aminoglicanos (Krishnamoorthy *et al.*, 2009), proteínas como las tetraspaninas, moléculas del MHC, actina y TSG101 (Ott, 2008) y RNAs virales (Pegtel *et al.*, 2010). De modo que se propone que el HIV-1 sea generado por la misma ruta de biogénesis exosomal o haga “uso” de múltiples moléculas involucradas en dicho proceso y, al portar una cantidad sustancial de moléculas propias del hospedero (Gould *et al.*, 2003), esto pueda ser uno de los mecanismos utilizados por el virus con el propósito de evadir la respuesta inmune y de facilitar el transporte de célula a célula de componentes virales involucrados en la patogenia. Algunas proteínas virales, como la proteína Nef del HIV, un factor de virulencia, contiene las señales necesarias para su clasificación directa en exosomas (Lenassi *et al.*, 2010) como un mecanismo de promoción de la infección, al igual que la presencia en exosomas de los co-receptores CCR5 y CXCR4 (Mack *et al.*, 2000; Rozmyslowicz *et al.*, 2003), la proteína estructural Gag (Fang *et al.*, 2007), microARN (vmiR88, vmiR99, and vmiR-TAR) y ARN mensajero virales (Bernard *et al.*, 2014; Valadi *et al.*, 2007), ARN TAR (elemento de respuesta de trans-activación; Narayanan *et al.*, 2013), las moléculas CD45, CD86 y MHC-II (Esser *et al.*, 2001), la metalopeptidasa ADAM17 y la citocina pro-inflamatoria TNF- α (Arenaccio *et al.*, 2015; Arenaccio *et al.*, 2014). No obstante, también se han descrito exosomas con propiedades antivirales, secretados por parte del organismo hospedero; es decir, con el fin de inhibir la infección por el HIV. Tal es el caso de los exosomas que contienen la molécula APOBEC3G, una citidina deaminasa parte del sistema de defensa celular contra el HIV-1 y otros retrovirus, capaz de terminar la infección por el HIV mediante la desaminación de los residuos de citosina en uracilo en la cadena negativa del ADN viral durante la transcripción reversa (Khatua *et al.*, 2009; Okeoma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012); así como exosomas que contienen las moléculas CD4 (De Carvalho *et al.*, 2014), Interferón alfa y beta (IFN- α y IFN- β ; Barr *et al.*,

2008; Li *et al.*, 2013), TNF- α y diversas interleucinas (Bailer *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 1999); anticuerpos IgA e IgG (Requena *et al.*, 2008), mucina I (Saeland *et al.*, 2009), oligosacáridos (Hong *et al.*, 2009) entre otros (Teow *et al.*, 2016).

Se ha encontrado una composición exosomal específica de micro ARNs, con capacidad de modulación del microambiente, en diversos tipos de cáncer producidos por el virus del papiloma humano (HPV), el poliomavirus de las células de Merkel (MCV), HCV, el virus de la Hepatitis B (HBV), el virus Epstein-Barr (EBV), el herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) y el HTLV-1 (Melo *et al.*, 2014; Pfeffer S, 2004; Valadi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014). Por ejemplo, se ha observado que los exosomas aislados de pacientes infectados con HPV están enriquecidos en especies de micro ARNs que controlan la proliferación celular, senescencia y apoptosis; esta composición exosomal es dependiente de la expresión de los oncogenes virales E6/E7, sugiriendo que es uno de los mecanismos por los cuales el oncogén contribuye al crecimiento de las células cancerosas positivas para HPV (Honegger *et al.*, 2015).

Raposo *et al.*, (1996), demostraron que los linfocitos B infectados por el virus Epstein-Barr (EBV), un gamma herpes virus humano asociado a una variedad de cánceres linfoblastoides y epiteliales, secretan exosomas que contienen moléculas MHC II y que estas vesículas eran capaces de activar los clones de células T CD4+ específicas *in vitro* (Raposo *et al.*, 1996). Posteriormente, Zitvogel *et al.*, 1998, publicó un estudio que muestra que los exosomas liberados por las células dendríticas tienen la capacidad de suprimir el crecimiento de tumores *in vivo* (Zitvogel *et al.*, 1998). Lo cual condujo a la hipótesis de que los exosomas podrían ser utilizados como agentes terapéuticos en la modulación de la respuesta inmune. A su vez, se observó que algunas células cancerosas infectadas con EBV secretan exosomas que contienen ARN mensajero que codifica para EBV en fase latente (Canitano *et al.*, 2013), micro ARN maduros que regulan negativamente genes inmunorreguladores específicos (Pegtel *et al.*, 2010), el principal oncogén viral expresado en la mayoría de los tumores asociados a EBV, LMP1 (proteína latente de membrana 1), que inhibe la respuesta inmune; es decir, la activación de linfocitos T, la proliferación y citotoxicidad de las células NK y la capacidad de las células para

producir interferón gamma (Dukers *et al.*, 2000; Flanagan *et al.*, 2003), así como exosomas que contienen grandes cantidades de la proteína inmunorreguladora galectina-9, que es capaz de inducir la apoptosis de las células T CD4+ específicas de EBV (Keryer-Bibens *et al.*, 2006). En contraste, se encontró que los exosomas liberados por linfocitos B infectados por EBV ejercen un efecto estimulante en los linfocitos no infectados, conduciendo a su proliferación, recombinación de cambio de clase y diferenciación en células de plasmablasto (Gutzeit *et al.*, 2014).

Los exosomas derivados de células infectadas por el virus linfotrópico de células T humanas de tipo 1 (HTLV-1) contienen los transcritos Tax, HBZ y el ARN mensajero del gen Env, sugiriendo que éstos pueden servir como vehículos para entregar ARN mensajero funcional del HTLV-1 a células receptoras (Jaworski *et al.*, 2014). Otro enfoque interesante lo proporciona la infección por el virus del herpes simple 1 (HSV1), donde las células exportan el sensor inmune innato STING (estimulador de los genes de IFN), micro ARN virales y ARN mensajeros a través de exosomas que son entregados a células no infectadas; siguiendo una estrategia funcional poco clara de supresión de la reactivación del virus latente, lo cual sugiere que, en circunstancias específicas, el HSV1 ha desarrollado mecanismos para restringir, en lugar de diseminar, la propagación de la infección (Kalamvoki *et al.*, 2014).

Como ya se mencionó, los exosomas pueden transferir proteínas funcionales, lípidos y un set distintivo de ARNs en condiciones patológicas como promoción de la infección o para defensa del hospedero, desencadenando una respuesta inmune, ya sea mediante la transferencia de antígenos derivados del virus o bien, de factores de virulencia; no obstante, se sabe que los exosomas también pueden jugar un papel clave en la dispersión viral. Incluso se ha propuesto la “hipótesis del exosoma Troyano”, la cual postula que los virus envueltos, particularmente los retrovirus (como el HIV-1), han evolucionado para utilizar la ruta pre-existente del hospedero de biogénesis de exosomas para la formación de virus infecciosos y pueden a su vez utilizar un modo de infección mediante el encubrimiento y captación de exosomas, una estrategia quizás poco eficiente pero con implicaciones de evasión inmune importantes (Gould *et al.*, 2003). De modo que los exosomas secretados de esta manera pueden posteriormente infectar células permisivas; es decir, los virus

podrían emplear las microvesículas para producir infección o para sobrevivir (Nour and Modis, 2014; Ramakrishnaiah *et al.*, 2013; van der Pol *et al.*, 2012a).

La transmisión viral mediante exosomas, se ha descrito ya para el HIV-1, donde la captura del virus por células dendríticas inmaduras produce partículas virales asociadas a exosomas que expresan HLA-DR1, CD1b, tetraspaninas como CD9 y CD63, así como glicoproteínas derivadas del hospedero; de esta manera, estos exosomas fueron capaces de iniciar una infección productiva en células T CD4⁺ escapando al reconocimiento por el sistema inmune (Van Der Pol *et al.*, 2012b; Wiley and Gummuluru, 2006). Mientras que durante la infección por el Pegivirus humano (anteriormente conocido como el virus de la Hepatitis G), un virus RNA del género *Flaviviridae*, se han aislado microvesículas de tipo exosomal que portan RNA viral y son capaces de transmitir el genoma del virus a células mononucleares de sangre periférica *in vitro*, resultando en una infección productiva (Chivero *et al.*, 2014). Siguiendo la estrategia de aprovechamiento de los exosomas con el fin de evasión de la respuesta inmune, o incluso como reservorios de latencia del virus, se ha visto que el virus de la hepatitis A (HAV), un virus no envuelto, se encuentra encapsulado en vesículas derivadas de membranas endosomales que se parecen a exosomas y como tal son secretados de las células infectadas, de modo que el virus queda protegido de la respuesta inmune mediada por anticuerpos y las partículas virales, así como el genoma viral completo, pueden ser transmitidos a células dendríticas plasmacitoides (Feng *et al.*, 2013; Pietschmann *et al.*, 2002).

A su vez, se ha descrito la producción de exosomas portadores del virus de la hepatitis C (HCV) en células de hepatoma humano Huh7.5.1 infectadas, donde se encontró que éstos contienen el ARN viral completo junto con proteínas del core y envoltura; este evento resultó en una infección productiva y en una resistencia parcial para anticuerpos neutralizantes, indicando una importante ruta de transmisión (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013) y sustentando un posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune mediado por exosomas, ya que independientemente a la infección primaria, los exosomas que portan el virus permiten una infección alternativa exitosa y persistente.

2.6 Exosomas y Virus Dengue

Además de la ruta de entrada canónica (a través de receptores) en diferentes virus, la vía endocítica es una ruta alterna de entrada viral en células permisibles, que se puede llevar a cabo por algunos virus; en la cual, una vez formado el endosoma temprano que lleva la partícula viral, algunos virus fusionan su envoltura con las vesículas intraluminales del endosoma, liberando así su genoma para ser posteriormente transferido a los compartimentos endosomales tardíos; de esta manera, estas vesículas intraluminales pueden funcionar como transportadores de la nucleocápside viral (como sucede con el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la Hepatitis C y el HIV) ya sea para su replicación, degradación o pueden ser secretadas como exosomas (Nour and Modis, 2014; Ramakrishnaiah *et al.*, 2013). La convergencia a diversos niveles entre la ruta de biogénesis exosomal y el ciclo replicativo de los virus, resulta benéfico para los patógenos en el establecimiento exitoso de la infección. Esta convergencia no es ajena a Flavivirus como el virus de la encefalitis japonesa, al virus del Nilo Occidental, al virus de la fiebre amarilla y al Virus Dengue, los cuales, utilizan la ruta endocítica para entrar a la célula hospedera (usualmente por endocitosis dependiente de clatrina, balsas lipídicas o caveolina), a lo largo de la cual, se llevan a cabo distintos cambios en la composición lipídica y en el pH del medio, proporcionando una serie de ambientes específicos para que diversas funciones virales o celulares ocurran.

Una de las rutas de entrada ya descritas del virus del Dengue es por endocitosis mediada por receptor (Van Der Schaar *et al.*, 2008), por lo que podría tener rutas de convergencia en su ciclo replicativo con la generación de exosomas; sin embargo, su secreción a través de exosomas no ha sido estudiada. No obstante, ya ha sido observada una población heterogénea de partículas similares al virus del Dengue aisladas o en compartimentos endosomales, sin que hayan sido caracterizadas o se haya estudiado una posible participación en la infección (Clark *et al.*, 2012).

Higa *et al.*, en 2008, sugirió que las células HepG2 infectadas por DENV, producen exosomas como parte de su secretoma, mientras que Martins *et al.*, en 2012, observó la producción de exosomas en células dendríticas infectadas con DENV, encontrando que estos exosomas transportan ARN mensajero y micro ARN asociados con el proceso apoptótico de las células dendríticas (Higa *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2012).

Por otro lado, un conjunto de proteínas llamadas proteínas transmembrana 1, 2 y 3 inducidas por IFN (IFITM1, 2 y 3) han demostrado actividad antiviral, confiriendo resistencia a las células hospederas contra diversos patógenos virales. En un estudio Zhu *et al.*, (2015) encontraron que el nivel de proteína IFITM3 en las células hospederas, se correlaciona inversamente con su susceptibilidad a la infección por DENV-2. Los exosomas derivados de células HUVEC o HepG2 contienen a la proteína IFITM3 y fueron capaces de transferirla a células vecinas, con lo cual pudieron determinar que en las células receptoras la infección por DENV-2 fue suprimida de manera efectiva por los exosomas portadores de IFITM3 de manera dosis dependiente; esto al reducir la penetración del DENV-2 en las células susceptibles (Zhu *et al.*, 2015). No obstante, se sabe muy poco sobre el papel que desempeñan los exosomas en la infección del virus Dengue.

Se sabe que aproximadamente un 20% del Virus Dengue fusiona su envoltura en los endosomas tempranos, estableciendo una especie de intermediarios de “hemifusión” restringida (Zaitseva *et al.*, 2010), mientras que el resto de la fusión completa se da en endosomas tardíos (Van Der Schaar *et al.*, 2008), principalmente en endosomas Rab7 positivos (Nour *et al.*, 2013), aunque para algunas cepas y serotipos han sido reportados otros mecanismos de entrada independientes a Rab7, como Rab5 (Krishnan *et al.*, 2007), la GTPasa dinamina (Acosta *et al.*, 2009) y la presencia de lípidos aniónicos como la fosfatidilserina para una fusión efectiva; el colesterol, aunque no estrictamente necesario, incrementa la fusión (Zaitseva *et al.*, 2010). Hasta la fecha no se han dilucidado los posibles mecanismos que se llevan a cabo en los compartimentos endocíticos durante la infección por el DENV-2, de esta manera, se plantea la posibilidad de que, ya estando en el endosoma tardío, el

Virus Dengue se fusione con vesículas intraluminales, generando así exosomas que lleven distintos componentes virales dentro o en su superficie, como la glicoproteína de envoltura E o genoma viral, como ocurre para el Flavivirus HCV.

La posibilidad de la generación de exosomas “troyanos” durante la infección por el Virus Dengue, como ruta alterna de infección, evasión o modulación de la respuesta inmune, se plantea como un proceso importante que podría establecer las bases de los mecanismos por los cuales algunos pacientes pueden progresar a las formas graves de la enfermedad (con la posibilidad de escapar al sistema inmune y/o por la diseminación sistémica del DENV).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La transmisión viral mediante exosomas se ha descrito previamente para el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus Epstein Barr, el Pegivirus humano, el virus de la Hepatitis A y para el virus de la hepatitis C, en donde la transmisión viral mediante “exosomas troyanos”, favoreció tanto una infección productiva de HCV como una resistencia parcial para anticuerpos neutralizantes (Feng *et al.*, 2013; Ramakrishnaiah *et al.*, 2013); lo cual, sustenta un posible mecanismo de evasión inmune y la propagación viral. El virus de la hepatitis C pertenece a la misma familia que el virus Dengue (*Flaviviridae*) y, aunque es una infección crónica, en la que la estrategia viral para evadir la respuesta inmune mediante su encubrimiento en exosomas sea sumamente útil para la presencia constante del virus; en el caso de una infección aguda, como lo es la del virus Dengue, se desconocen a profundidad los mecanismos moleculares implicados en el progreso a las formas graves de la enfermedad, por lo que es de suma importancia dilucidar si este virus también es capaz de evadir la respuesta inmune y propagar la infección mediante exosomas, que puedan transportar y transferir el genoma viral a células previamente no infectadas, contribuyendo a la estimulación del sistema inmune o a la disminución en la clarificación viral y/o persistencia antigénica.

Con base en lo anterior, nos propusimos evaluar si durante la infección de células diana (monocitos) por el DENV, existe la generación de exosomas que puedan participar como un exosoma “troyano” durante el proceso infeccioso de estas células (ya sea que contengan partículas virales completas, la nucleocápside o el genoma viral), o bien durante la activación celular (inducción de respuesta inmune y/o en el proceso de evasión de la respuesta inmune del hospedero). Con base en este planteamiento, proponemos la siguiente hipótesis.

IV. HIPÓTESIS

Durante la infección de monocitos humanos por el virus dengue se producen exosomas “troyanos” capaces de infectar nuevas células diana.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de exosomas DENV (+) derivados de monocitos humanos en la transmisión del Virus Dengue.

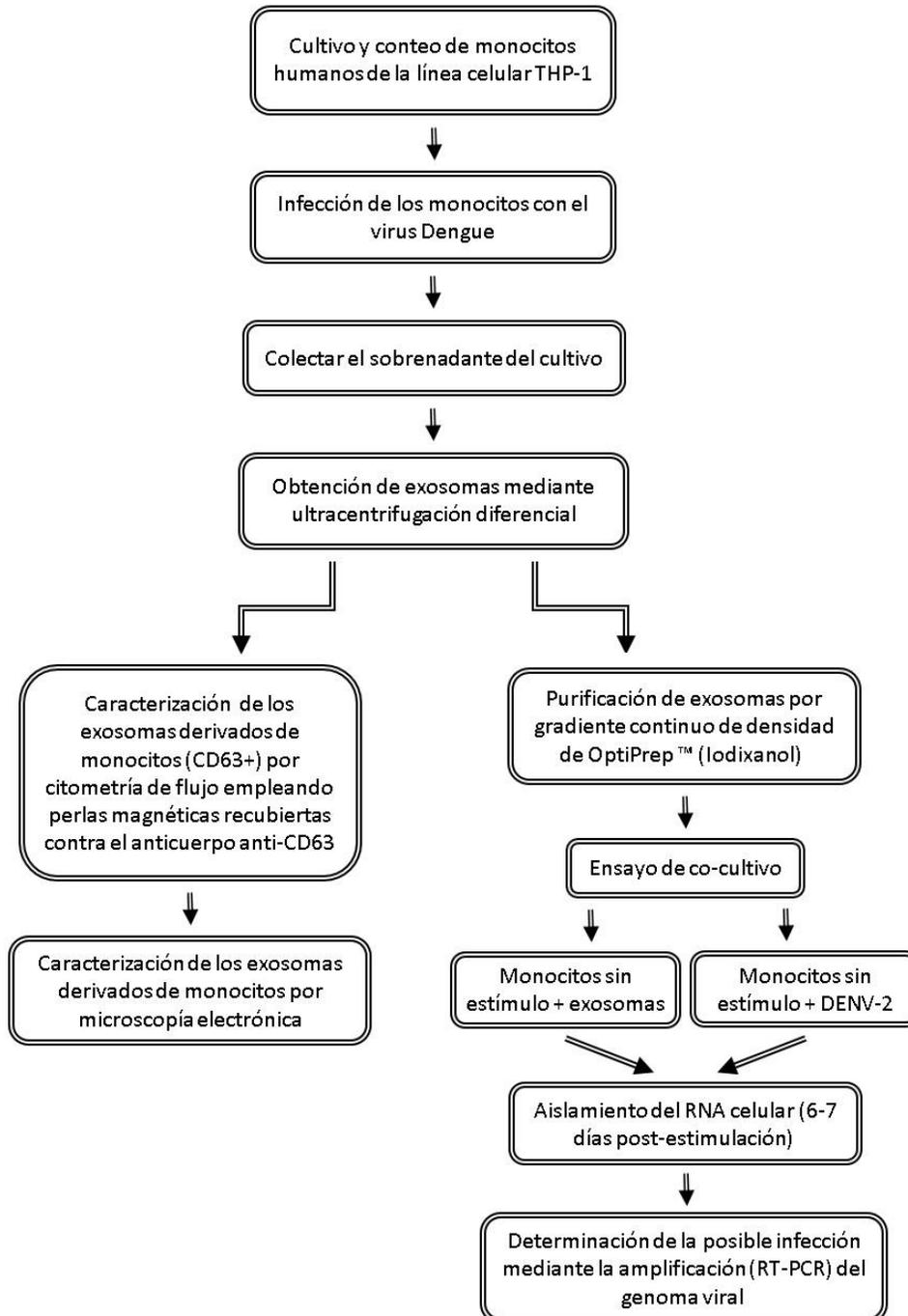
5.1 Objetivos particulares

1. Obtener exosomas provenientes de monocitos humanos primarios (de donadores sanos) y/o monocitos THP-1 infectados con DENV mediante ultracentrifugación diferencial.
2. Caracterización de los exosomas mediante: Citometría de flujo (identificación de la tetraspanina CD63+), microscopía electrónica y análisis por rastreo de nanopartículas (NTA).
3. Identificación del genoma del DENV en exosomas CD63+ mediante RT-PCR.
4. Evaluar la posible transmisión del DENV (o su genoma) mediante exosomas en co-cultivos de monocitos humanos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Con base en los objetivos planteados, se diseñó la siguiente estrategia experimental:



6.2 Cultivo, amplificación y titulación del virus Dengue empleando la línea celular LLC-MK2

Para el desarrollo del presente trabajo, se utilizó un aislado viral procedente de un caso de Dengue clásico serotipo-2, siendo ésta la cepa prototipo del Virus Dengue 2, denominada DENV-2 Nueva Guinea- C. La amplificación viral se llevó a cabo utilizando cultivos de la línea celular de riñón de mono verde africano LLC-MK2, a confluencia del 90%, en cajas para cultivo celular con medio suplementado y filtrado por vacío (medio “DMEM High Glucose” suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino). Posteriormente, los cultivos se inocularon con el DENV-2 NGC a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 y se incubaron a 37°C con 85% de humedad y 5% de CO₂;

El título viral se determinó mediante ensayo de placa lítica, para lo cual se sembraron células LLC-MK2 en cajas de 6 pozos con medio DMEM y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta obtener una monocapa al 90% de confluencia. Los cultivos fueron inoculados en medio sin complementar por duplicado, empleando diluciones seriadas en base 10 (10^{-1} a 10^{-6}), tomando para la primera dilución 0.1 mL del stock de virus y 0.9 mL de medio. Previamente a la inoculación, se lavó cada pozo con PBS 1X dos veces y posteriormente se adicionaron 0.5 mL de la primera dilución viral a un pozo y se repitió este paso con las demás diluciones cubriéndose completamente la monocapa. Se dejó adsorber el virus por dos horas a 37°C con 5% de CO₂; a continuación se retiró el medio junto con el inóculo viral y se lavaron los pozos con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM; pH 7.4) para eliminar el virus no adsorbido. Se agregó a cada pozo 1 mL de medio completo suplementado con 1% de metilcelulosa y se incubó la caja a 37°C y 5% de CO₂ hasta que se observó el efecto citopático. Finalmente, se retiró el medio, se fijaron las células con metanol puro y se dejó evaporar el resto. Se tiñeron las monocapas con cristal violeta al 1% durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con abundante agua. El título viral se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula: $\text{PFU/mL} = n (10)$ (factor de dilución) en la que: n, número de placas contadas; 10, factor de corrección; factor de dilución

(correspondiente a la dilución en donde se hizo el conteo directo de las placas líticas)

6.3 Obtención de suero fetal bovino libre de exosomas

El suero fetal bovino (SFB) contiene exosomas, de modo que antes de su utilización en los cultivos celulares destinados a la producción y obtención de exosomas es importante eliminar las EVs presentes que puedan interferir con los resultados. De modo que previamente se filtró una alícuota de SFB utilizando un filtro estéril de 0.22 μm y mediante ultracentrifugación se descartaron las vesículas extracelulares presentes en el SFB. Para esto, previamente se lavaron los tubos de policarbonato para ultracentrífuga tres veces con agua estéril y se dejaron bajo la luz UV durante 15 minutos. Se agregaron 30 mL del SFB a los tubos y se equilibraron en la balanza analítica por pares. Se ultracentrifugaron a 25,800 rpm (120,000 g) en el rotor de ángulo móvil SW28 durante 2 horas. Se colectó el SFB y se descartó el pellet; el SFB se filtró nuevamente a través de un filtro estéril de 0.22 μm y se dejó a prueba de esterilidad en la incubadora a 37°C, atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

6.4 Cultivo de monocitos humanos de la línea celular THP-1

Para evaluar la posible producción de exosomas “troyanos” derivados de monocitos humanos (la célula diana del DENV), se decidió utilizar la línea celular monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202™), que es una línea de células no adherentes derivada de un paciente con leucemia monocítica (Tsuchiya *et al.*, 1980). Se cultivaron de 50-100x10⁶ células en cajas de cultivo F150, empleando medio RPMI 1640 (Biowest, L0500-500) suplementado al 10% con SFB, antibióticos (0.1mg/ml de estreptomina y 100U/ml de penicilina), 1% de L-Glutamina 2mM y 0.05mM de 2-mercaptoetanol, a 37°C y 5% de CO₂. Una vez obtenido el número necesario de células de acuerdo al ensayo por realizar, se centrifugaron las células, se retiró el medio y se agregó medio fresco RPMI no suplementado en presencia del DENV2-

NGC a una MOI de 0.1, se dejó adsorber durante 2 horas y se agregó medio fresco RPMI suplementado al 5% con SFB, antibióticos (0.1mg/ml de estreptomicina y 100U/ml de penicilina) y 1% de L-Glutamina 2mM y se dejó en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 y 72 horas.

6.5 Obtención de exosomas derivados de monocitos humanos de la línea celular THP-1 por ultracentrifugación diferencial

Para la obtención y caracterización de exosomas derivados de monocitos humanos de la línea celular THP-1 se cultivaron 40 millones de células en cajas F75. Se inoculó un cultivo con DENV-2 NGC a una MOI de 0.1 en medio RPMI sin complementar, suficiente para cubrir la pared de la caja; se dejó adsorber por 2 horas y se agregó medio fresco suplementado al 5% con SFB libre de exosomas, 0.1mg/ml de estreptomicina, 100U/ml de penicilina y 1% de L-glutamina 2mM; posteriormente las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂, durante 48-72 horas y se empleó otro cultivo de células sin inóculo como control negativo.

Para la purificación de los exosomas se utilizó un rotor de ángulo móvil (SW28) de acuerdo al protocolo de purificación de exosomas por ultracentrifugación diferencial (Théry *et al.*, 2006). Brevemente, se colectó la suspensión celular en tubos Falcon estériles de 50mL 48 horas post-infección; se centrifugaron a 300 g (1,360 rpm) durante 10 minutos y posteriormente a 2000 g (3,510 rpm) durante 10 minutos en una centrífuga Beckman con rotor GH 3.8. El sobrenadante de los cultivos se transfirió a tubos de pared delgada, ultra-transparentes de 38.5 mL, 25 x 89 mm para ultracentrífuga (Beckman 344058), previamente esterilizados por lavados con agua oxigenada y radiación con luz UV, y se balancearon por pares con PBS 1X. Se ultracentrifugaron a 10,000 g (7,500 rpm) por 30 minutos, se transfirió el sobrenadante a tubos limpios y se ultracentrifugó a 100,000 (24,000 rpm) durante 110 minutos; el pellet obtenido se lavó con PBS 1X y se ultracentrifugó nuevamente a 100,000 g por 110 minutos en un rotor SW28 (Fig. 9). El pellet obtenido se

resuspendió en 200 μ L de PBS 1X, se mantuvo a 4°C hasta su posterior uso y se cuantificó el total de proteína obtenida mediante ensayo de Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific 23235) de acuerdo al fabricante.

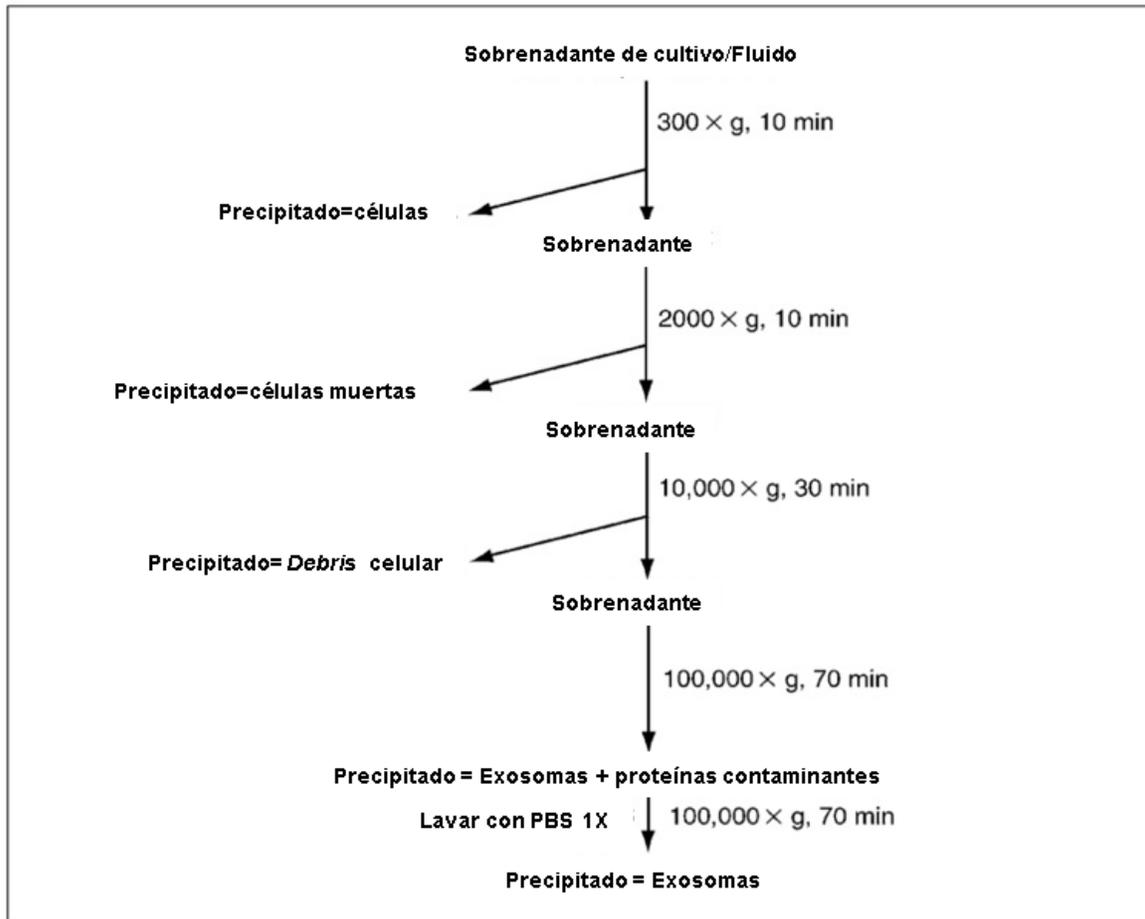


Figura 9. Diagrama de flujo para el procedimiento de purificación de exosomas mediante ultracentrifugación diferencial. La velocidad y la duración de cada centrifugación se indican a la derecha de las flechas. Después cada una de las tres primeras centrifugaciones, los pellets (células, células muertas y restos celulares) son descartados y el sobrenadante se conserva para el siguiente paso. En contraste, después de las dos centrifugaciones de 100,000 g, los pellets se conservan y los sobrenadantes se descartan (Théry *et al.*, 2006).

6.6 Caracterización de exosomas derivados de monocitos humanos de la línea celular THP-1 por citometría de flujo

La citometría de flujo convencional no es una técnica que permita el análisis de exosomas, puesto que su límite de detección empleando perlas de poliestireno es de 200 nm y de 300 nm para muestras biológicas, de modo que los exosomas, de 30 a 120 nm, caen en el fondo de lectura. No obstante, la posibilidad de inmunoislar exosomas mediante perlas superparamagnéticas de 5 μm , recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para algún antígeno expresado en los exosomas, permite formar un complejo con éstos, que, una vez teñidos, son detectados por el citómetro convencional.

De esta manera, para la caracterización de los exosomas por citometría de flujo se emplearon perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de membrana CD63 expresado en la mayoría de los

exosomas humanos, utilizando el kit de Invitrogen™ (10606D), Exosome – Human

Diagrama de Flujo del Aislamiento de los Exosomas y su Detección



Figura 10. Protocolo general del uso de las perlas (Dynabeads) para su uso en citometría de flujo (Human & Isolation 2013).

CD63 Isolation/Detection (from cell culture media, Protocol for use in Flow Cytometry). Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Fig. 10); brevemente, el pellet de exosomas obtenido mediante ultracentrifugación diferencial se mezcló con

Perla recubierta del anticuerpo contra CD63

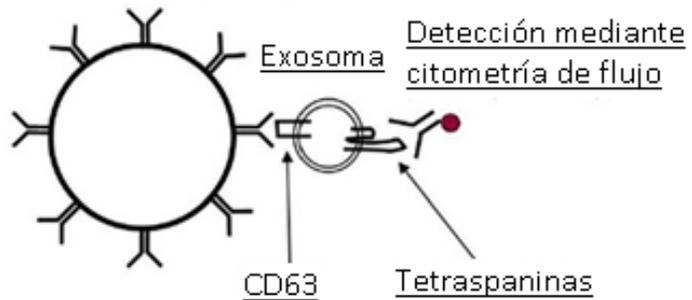


Figura 11. Complejo de perlas-exosomas-anticuerpo CD63-PE (Human & Isolation 2013).

aproximadamente 20µL de las perlas acopladas a CD63, resuspendidas en el vórtex durante 30 segundos; se dejó en incubación por 16-20 horas, se realizó la separación magnética del complejo ya formado de las perlas-exosomas y posteriormente se llevaron a cabo diversos lavados para eliminar posibles contaminantes presentes aún en la muestra. Posteriormente se hizo una curva de concentración de proteínas empleando tres puntos (25, 50 y 100 µg/mL) para la cuantificación por proteína de los exosomas. Para la tinción del complejo de perlas y exosomas se usó un anticuerpo monoclonal Mouse Anti-Human CD63 acoplado a ficoeritrina (PE; BDBiosciences 557305); previamente titulado mediante la evaluación de distintos volúmenes del anticuerpo en exosomas obtenidos a partir de células sin estimulación: 20µL, 10µL, 5µL y 1µL. El anticuerpo CD63-PE (AB CD63-PE) se dejó en incubación con los exosomas ya unidos a las perlas, formándose un complejo de perlas-exosomas-AB CD63-PE, como se observa en la Fig. 11, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente, las muestras se resuspendieron en PBS 1X y finalmente se analizaron mediante Citometría de flujo en un Facsclibur. Los datos de los histogramas se evaluaron con el software CellQuest® y FlowJo® Versión 7.6.1. Se estimó la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF).

6.7 Caracterización morfológica de los exosomas derivados de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus del Dengue por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la caracterización morfológica de los exosomas, se cultivaron y contaron aproximadamente 80 millones de monocitos humanos de la línea celular THP-1, se centrifugó el cultivo, las células se transfirieron a una caja F150 y se inocularon con DENV-2 NGC a una MOI de 0.1 en medio RPMI sin complementar, suficiente para cubrir la pared de la caja de cultivo, a una MOI=0.1; se dejó adsorber por 2 horas y se agregó medio fresco suplementado al 5% con SFB libre de exosomas, 0.1mg/ml de estreptomina, 100U/ml de penicilina y 1% de L-Glutamina 2mM; se incubó durante 72 horas y otro cultivo sin inóculo se utilizó como control negativo.

Posteriormente, para la obtención de exosomas mediante ultracentrifugación se empleó el protocolo para la purificación de exosomas por ultracentrifugación diferencial previamente descrito (Théry *et al.*, 2006): se colectó la suspensión celular en tubos Falcon estériles de 50mL 72 horas post-infección; se centrifugaron a 300 g (1,360 rpm) durante 10 minutos y posteriormente a 2000 g (3,510 rpm) durante 10 minutos en una centrífuga Beckman con rotor GH 3.8. El sobrenadante se transfirió a tubos de pared delgada, ultra-transparentes de 38.5 mL, 25 x 89 mm para ultracentrífuga y se balancearon por pares con PBS 1X. Se ultracentrifugaron a 10,000 g (7,500 rpm) por 30 minutos, se transfirió el sobrenadante a tubos limpios y se ultracentrifugó a 100,000 (24,000 rpm) durante 110 minutos; el pellet obtenido se lavó con PBS y nuevamente se ultracentrifugó a 100,000 g por 110 minutos en un rotor SW28 (Fig. 1). Se retiró el sobrenadante y se preparó la muestra para el microscopio de transmisión electrónica (TEM).

La muestra se fijó en una mezcla de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.2, a temperatura ambiente durante 2 horas; posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Enseguida se llevó a cabo la post-fijación con tetraóxido de osmio al 2% durante una hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrida la post-fijación se realizaron tres lavados con PBS para retirar el fijador no incorporado a la muestra. Ésta se

deshidrató en alcoholes graduales del 30, 50, 70, 80, 90 y 96% (5 minutos en cada alcohol), y tres cambios de 5 minutos en alcohol absoluto (100%).

Posteriormente, se hicieron tres cambios de 5 minutos cada uno en óxido de propileno y la muestra se colocó en una mezcla de óxido de propileno-resina epóxica en una proporción 1:1 durante 18 horas. Transcurrido el tiempo se destapó el tubo *ependorff* de 1.5 mL que contenía la muestra para que se evaporara el óxido de propileno y la resina penetrara a la muestra. Por último, se retiró la resina restante del tubo y se añadió resina epóxica pura a la muestra. Se colocó el tubo *ependorff* en una estufa a 60°C durante 48 horas.

Se llevó a cabo la obtención de cortes ultra finos de la muestra de 40 a 50 nm de grosor en un ultramicrotomo Leica EM UC7 y se montaron en rejillas de cobre cubiertas con Formvar. Los cortes montados en las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo por 30 minutos y citrato de plomo por 10 minutos.

Finalmente, los cortes se observaron en un microscopio electrónico modelo JEOL JEM 1010, operando a 80 KV.

6.8 Purificación de exosomas por gradiente continuo de velocidad de OptiPrep™ (Iodixanol)

Para asegurar la separación de los exosomas de las partículas virales, puesto que la ultracentrifugación diferencial no es suficiente para eliminar al virus del pellet obtenido (debido a la similitud de ambos en densidad y tamaño), se empleó un gradiente continuo de velocidad de OptiPrep™ (Iodixanol). Para lo cual, se cultivaron y contaron aproximadamente >220 millones de monocitos humanos de la línea celular THP-1, se centrifugó el cultivo, las células se transfirieron a dos o tres cajas F150 y se infectaron con DENV-2 NGC en medio RPMI sin complementar, suficiente para cubrir la pared de la caja, a una MOI=0.1; se dejó adsorber por 2 horas y se agregó medio RPMI fresco suplementado al 5% con SFB libre de exosomas, se incubó durante 72 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se empleó el protocolo reportado por Konadu *et al.*, 2016, para la separación de exosomas y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV-1): a partir del cultivo inicial se llevaron a cabo el método de centrifugación diferencial a 4°C de acuerdo a lo anteriormente descrito; Brevemente, se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 300 g por 10 minutos para descartar el pellet celular, se transfirió a tubos limpios y se centrifugó a 2,000 g por 10 minutos para descartar el pellet de células muertas, posteriormente se ultracentrifugó a 10,000 g por 30 minutos para eliminar el pellet de micropartículas y demás restos celulares y se ultracentrifugó a 100,000 g por 110 minutos para obtener el pellet exosomal; posteriormente, éste se resuspendió y lavó en abundante PBS 1X, se filtró utilizando un filtro de 0.22µm y se ultracentrifugó nuevamente a 100,000 g por 110 minutos. El pellet exosomal se resuspendió en 500 µL de PBS 1X y se guardó a 4°C (Fig. 12), hasta su uso (Konadu *et al.*, 2016).

Paralelamente, en la última ultracentrifugación se lavó con peróxido de hidrógeno y agua estéril la cámara dual para hacer el gradiente continuo de OptiPrep™, se prepararon 6 mL de OptiPrep™ al 6% y 6 mL de OptiPrep™ al 18% con PBS 1X y se colocaron 5.5 mL de la solución al 6% en la primera columna y 5.5 mL de la solución al 18% en la segunda columna de la cámara para formar el gradiente. Con ayuda de una bomba peristáltica se formó el gradiente continuo de OptiPrep™ y en la parte superior se agregaron los 500 µL en los que se resuspendió el pellet exosomal. Se ultracentrifugó en un rotor SW40Ti a 250,000g por 2 horas a 4°C y se colectaron 11 fracciones de 1 mL y una doceava de 500µL de arriba abajo del gradiente y fueron transferidas a tubos de 1.5 mL; Las muestras se lavaron con abundante PBS y se ultracentrifugaron a 120,000 g por 130 minutos. Se retiró la mayor cantidad posible de sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200-500µL de PBS 1X; las fracciones se guardaron a 4°C hasta su posterior análisis mediante rastreo de nanopartículas (NTA empleando el NanoSight NS300 equipado con el software de análisis NTA versión 3.1, en la Universidad Iberoamericana, Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Campus Santa Fe, Ciudad de México) y Citometría de flujo (mediante perlas acopladas a CD63), con el fin de

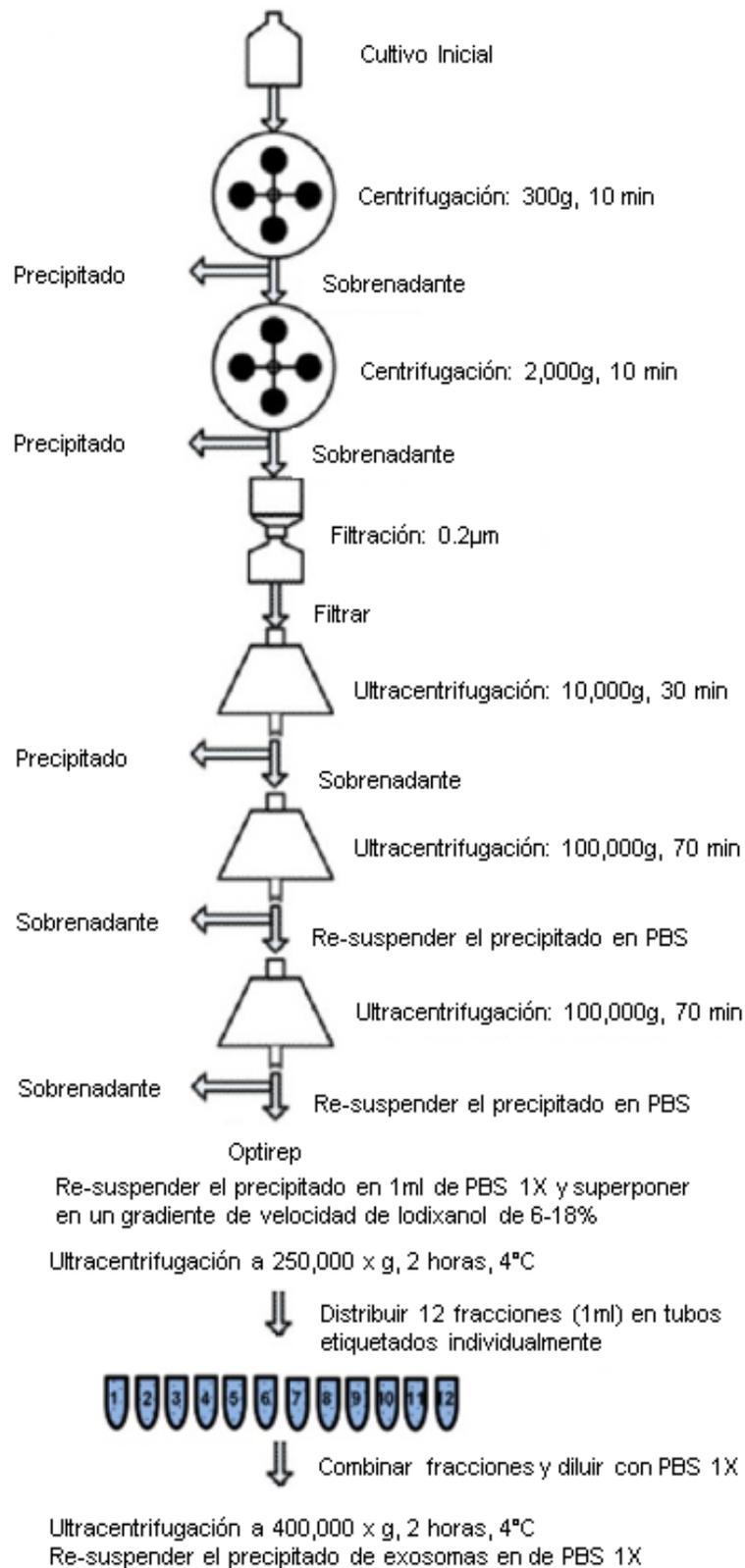


Figura 12. Representación esquemática de la purificación de los exosomas derivados de monocitos humanos infectados con el virus Dengue mediante un gradiente continuo de velocidad de Iodixanol (OptiPrep™; Sampey *et al.*, 2014a; Konadu *et al.*, 2016; Sampey *et al.*, 2014a).

evaluar las fracciones en las que se encontraba un enriquecimiento de los exosomas.

Una vez analizadas las fracciones de manera individual y habiendo estandarizado los parámetros adecuados de lectura, dilución y concentración de muestra, con base en los resultados, se procedió al análisis por NTA de la combinación de las siguientes fracciones: fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12; siguiendo el mismo protocolo previamente descrito, empleando un menor número de células para la obtención de exosomas, tanto para el control negativo (20 millones de células sin estímulo), como para la muestra estimulada con DENV (20 millones de células infectadas con el DENV-2 NGC a MOI de 0.1).

6.9 Análisis por rastreo de nanopartículas (NTA)

Para cuantificar e identificar el tamaño de las partículas presentes en las fracciones obtenidas mediante el gradiente continuo de velocidad de Iodixanol, se llevó a cabo el análisis por rastreo de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés), empleando el NanoSight NS300 equipado con el software de análisis NTA versión 3.1, en la Universidad Iberoamericana, Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Campus Santa Fe, Ciudad de México. De este modo, para estandarizar la lectura de muestras en el NanoSight, se analizaron las fracciones individuales, y posteriormente la combinación de las fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12, obtenidas mediante el gradiente de OptiPrep™ realizando diluciones de las muestras hasta encontrar la dilución adecuada (1:50), con PBS filtrado a través de un filtro de 0.22 μm , que permitiesen obtener un rango de concentración entre 10^6 y 10^9 partículas/mL (rango confiable de lectura del equipo). Se limpió y secó el módulo desmontable del NanoSight, se ajustaron los parámetros de análisis con

perlas de poliestireno de 100nm calibradas (NTA4088, Malvern), se lavó el módulo y posteriormente se cargó 1mL de la muestra con jeringas de 10mL estériles, cuidando no generar burbujas de aire, se ajustó a 20°C la temperatura, así como el nivel de cámara a 14 y un umbral de detección de 2.0 y se tomó un video de 30

segundos para cada muestra por triplicado; de modo que se analizaran y cuantificaran la mayor cantidad posible de partículas presentes en la muestra, así como las más pequeñas y no únicamente las más grandes. El reporte de resultados del equipo arrojó datos como el tamaño en nm de todas las partículas detectadas, su concentración, el porcentaje de partículas entre 30-120 nm, así como la media, moda, desviación estándar y distribución del tamaño de partículas (Fig. 13).

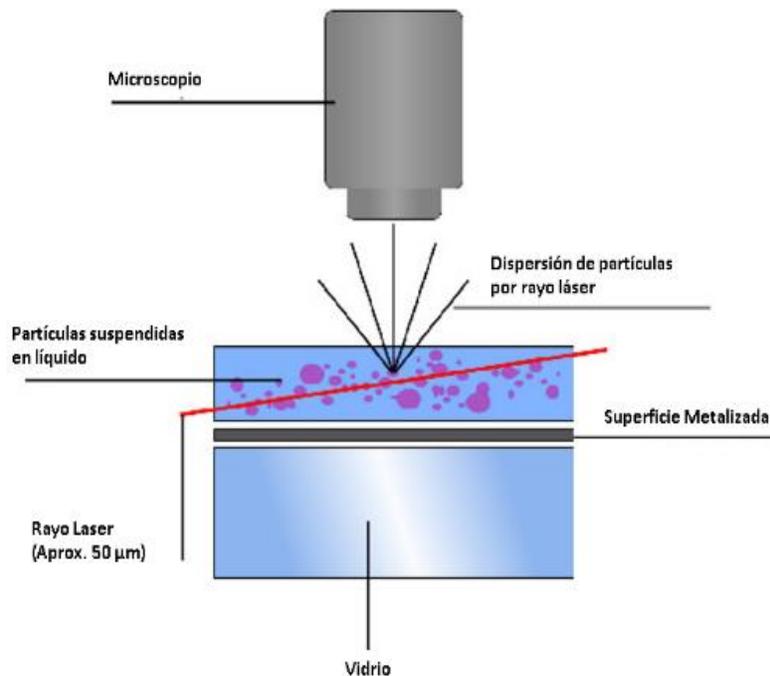


Figura 13. Principio del Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA). Un rayo láser pasa a través de la cámara donde se deposita la muestra, posteriormente una cámara en combinación con un microscopio captura las partículas que presentan movimiento browniano. Mediante la aplicación de la ecuación Einstein-Stokes, se pueden determinar los parámetros hidrodinámicos asociados a cada tipo de, así como se puede ser determinada su concentración y el tamaño de cada partícula (Erdbrügger and Lannigan, 2015).

6.10 RT-PCR

Purificación de RNA (Kit de Qiagen)

Con el fin de determinar la posible infección mediada por los exosomas mediante la amplificación del genoma viral, se llevó a cabo el aislamiento del RNA de las fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12 obtenidas a partir del gradiente continuo de Iodixanol, utilizando el kit QIAamp® Viral RNA Mini (Qiagen 2010) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Brevemente: Las muestras a temperatura ambiente se prepararon de la siguiente manera; En el buffer AVE (15-25°C) se pipetearon 560 µL de la mezcla buffer AVL-acarreador de RNA en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregó a la muestra la mezcla buffer AVL-acarreador de RNA y se mezcló en vórtex por 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se dio un spin al tubo. Se agregaron 560 µL de etanol (96-100%) a la muestra y se puso en el vórtex, en pulsos, durante 15 segundos; se dio otro spin al tubo. Se transfirió la muestra a un cartucho de giro y se centrifugó a 6,000 rpm durante 1 minuto. Se colocó la columna de giro en un tubo limpio de colección de 2 mL y se desechó el tubo que contenía el filtrado. Se agregaron 500 µL del buffer AW2 y se centrifugó a 6,000 rpm por 3 minutos. Se colocó la columna de giro en un tubo limpio de 2 mL y se descartó el tubo con el filtrado. Se colocó la columna de giro en un tubo eppendorf limpio de 1.5 mL, se desechó el tubo del filtrado, se agregaron 60 µL del buffer AVE para eluir el RNA, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 6,000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, se cuantificó el RNA en el espectrofotómetro (NanoDrop 1000).

OneStep RT-PCR (Qiagen)

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando la enzima de un solo paso de Qiagen, OneStep RT-PCR kit (Technologies 2012), para las muestras previamente mencionadas, de acuerdo al siguiente protocolo, ajustando las cantidades de acuerdo al número de muestras, como se muestra en la Tabla :3.

Tabla 3. Cantidad de reactivos empleados en la reacción de RT-PCR OneStep RT-PCR (Qiagen).

OneStep RT-PCR (Qiagen)		
Reactivos	$\mu\text{L}/\text{muestra}$	4 muestras
Buffer 5X	4	26 μL
DNTPs 10mM	1	4 (400 μM)
Mix Enzyme	1	4
PRIMER A	1	3 (0.6 μM)
PRIMER B	1	3 (0.6 μM)
RNA	5	RNA o H_2O (1pg a 2 μg)
H_2O cbp. 20 μL	7	20

Las condiciones del RT-PCR fueron las siguientes:

Condiciones del RT-PCR	
Reacción RT	45°C/60 minutos
Inactivación de RT	95°C/15 minutos
Ciclos de RT	94°C/30 segundos 55°C/30 segundos 72°C/30 segundos
Extensión final	72°C/10 minutos 4°C/ ∞

La secuencia de los primers Forward 5'-3' y Reverse 3'-5' para el DENV es la siguiente:

Virus Dengue primer D1 5'- TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG -3'

primer D2 5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC -3'

Mientras que para GAPDH es:

GADPH sense 5'- CCA TGT TCG TCA TGG GTG TGA ACC -3'

antisense 5'- GCC AGT AGA GGC AGG GAT GAT GTT -3'

- La temperatura de alineación para DENV es de 55°C y para GAPDH (housekeeping gene usado como control) es de 55-60°C.
- Productos esperados: Dengue 511 pb y GAPDH 294 pb.

Posteriormente, se evaluaron los productos del RT-PCR mediante electroforesis en gel: se tiñó el DNA con bromuro de etidio al 2%, se tomaron 8 µL de la reacción, se preparó un gel de agarosa al 1.2%, se mezclaron las muestras con el buffer de carga y se corrió el gel aproximadamente 60-90 minutos. Éste se visualizó en el Typhoon™ FLA 9500 biomolecular imager.

6.11 Ensayo de co-cultivo

Para evaluar la posible infección mediada por exosomas derivados de monocitos infectados con el DENV-2 NGC y purificados por gradiente de iodixanol, se llevó a cabo un ensayo de co-cultivo, de acuerdo al siguiente protocolo: Se sembraron 250,000 monocitos THP-1 en una placa de 12 pozos utilizando los siguientes tratamientos:

- Monocitos THP-1 + 50 µg de proteína exosomal obtenida por gradiente de iodixanol y cuantificada por micro BCA (fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12).
- Monocitos THP-1 + DENV-2 NGC (MOI 0.1).
- *Mock infected*.

Las muestras se incubaron por 2 horas con 500 µL de medio RPMI no suplementado; transcurrido el tiempo, se agregó medio fresco RPMI suplementado al 5% con SFB ultracentrifugado y filtrado, para todos los tratamientos.

Posteriormente las muestras se incubaron durante 6-7 días y se procedió al análisis de los tratamientos mediante la purificación del RNA total celular, incluyendo el control positivo del stock viral empleado en los ensayos, y la amplificación del genoma viral por RT-PCR como previamente se detalló.

VII. RESULTADOS

7.1 Cultivo, amplificación y titulación del virus Dengue empleando la línea celular LLC-MK2

El cultivo, cosecha y titulación del Virus Dengue Serotipo 2, cepa Nueva Guinea C (DENV-2 NGC) se llevaron a cabo utilizando la línea de células epiteliales de riñón de mono verde LLC-MK2. En la Fig. 14 A se observa la monocapa confluyente de células sin infectar (control negativo), mientras que en la Fig. 14 B se muestra el cultivo de seis días post-infección, donde se observa el efecto citopático en las células mediante la formación de placas líticas; las cuales, se observan mediante la pérdida de la monocapa confluyente por lisis y desprendimiento de las células infectadas, resultando en espacios libres de células; así como se observa la presencia de proyecciones citoplásmicas y la acidificación del medio.

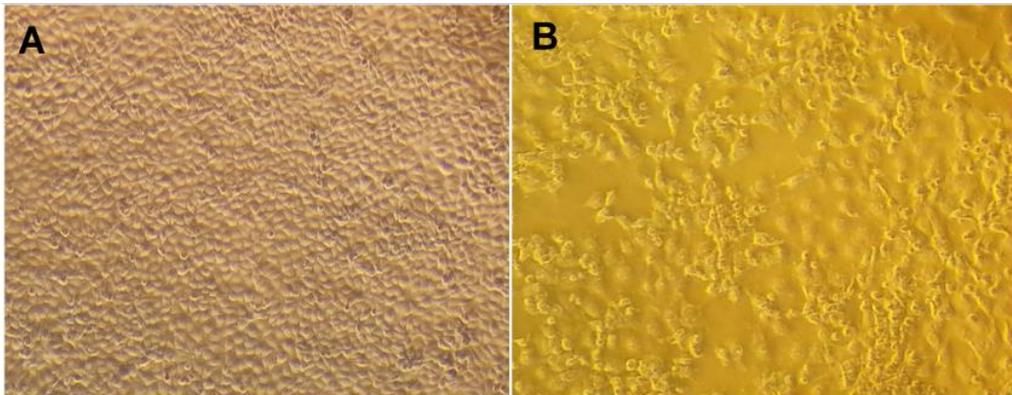


Figura 14. Cultivo de células LLC-MK2. A) Células sin infectar (control negativo). B) Células infectadas con DENV-2 NGC, 6 días post infección. Observadas con microscopio óptico a 10X.

Una vez observado el efecto citopático máximo en el cultivo infectado y previamente al desprendimiento de la monocapa celular, se colectó el sobrenadante del cultivo, se clarificó de restos celulares mediante centrifugación a 3000rpm durante 10 minutos a 4°C, la muestra se almacenó en alícuotas a -70°C y se procedió a la titulación viral mediante ensayo de placa lítica.

7.2 Placa lítica

El título viral del stock ya almacenado del DENV-2 NGC se determinó mediante ensayo de placa lítica. Alrededor del 12 de infección, se contaron las placas virales con ayuda del microscopio de luz y se calculó el título del virus en la muestra con la siguiente fórmula: $\text{ufp/ml} = (n)(10)(\text{F.D.})$; donde “n” son las placas virales que aparecen en la mayor dilución posible, “10” es el factor de corrección de 0.1 mL y “F.D.” es el factor de dilución.

Se obtuvo la siguiente placa lítica:

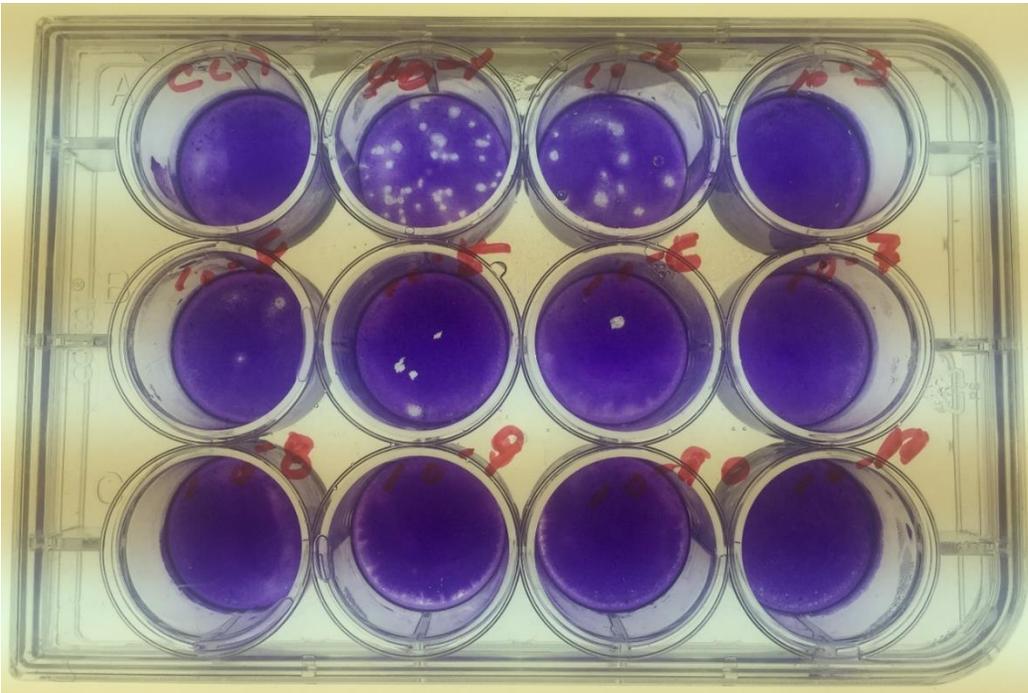


Figura 15. Titulación viral por ensayo de placa lítica. Se observa la formación de placas líticas debido a la lisis de las células LLC-MK2 por el DENV-2 NGC. Se realizó la placa por duplicado y con base en las diluciones logarítmicas en base 10 del stock viral se determinó el título. Como control negativo se emplearon células sin infectar (mock).

Se consideró la dilución más alta en la que se observó la formación de placa lítica; tomando así la dilución 10^6 , donde se observó una placa en ambos duplicados. Con base en la fórmula mencionada ($\text{UFP/ml} = (1)(10)(10^6)$), se obtuvo un título viral de 1×10^7 UFP/ml. Éste título posteriormente se utilizó para llevar a cabo todos los ensayos subsecuentes de infección.

7.4 Caracterización de exosomas derivados de monocitos humanos de la línea celular THP-1 por citometría de flujo

Para la obtención y caracterización de exosomas derivados de monocitos, se llevó a cabo la infección con DENV-2 NGC de un cultivo de monocitos THP-1 a una MOI 0.1, durante 48-72; observándose claramente el efecto citopático inducido por el DENV (pérdida de morfología circular, adherencia a la placa y extensión de filopodios, así como acúmulos de células que no corresponden propiamente a la formación de sincicios, pues aún se observa la individualidad de las células). De igual manera, se dejó un control negativo de células sin estímulo (*mock infected*), para evaluar la producción basal y por estímulo con DENV-2 de exosomas (Fig. 16).

Posteriormente se colectó el sobrenadante y se utilizó en el protocolo de ultracentrifugación diferencial ya descrito (Théry *et al.* 2006b); una vez obtenido el pellet de exosomas, se hizo la cuantificación de proteínas por microBCA y mediante una curva de concentración de proteínas empleando tres puntos (25, 50 y 100 µg/mL) se evaluó el inmunoaislamiento de la población de exosomas CD63+

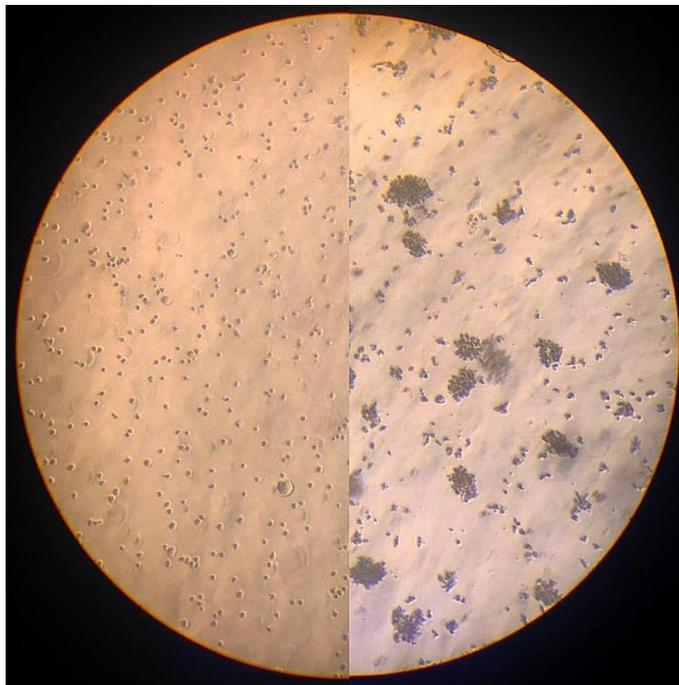


Figura 16. Cultivo de la línea celular monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202™). De lado izquierdo se observan las células sin infectar (control negativo) y de lado derecho se observa el efecto citopático de las células infectadas con DENV-2 NGC a MOI de 0.1, 72 horas post infección. Observadas con microscopio óptico a 10X.

utilizando perlas superparamagnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para la tetraspanina CD63 presente en la mayoría de los exosomas humanos. Se analizó la IMF de ambas muestras por señal del Ab CD63 acoplado a ficoeritrina mediante Citometría de flujo.

Se establecieron dos *gates* o regiones de análisis, R1 (región 1), corresponde a la población del complejo independiente de perlas-exosomas-anticuerpo y R2 (región 2), corresponde a la población del mismo complejo de perlas pero agregadas, en dímeros o trímeros (Fig. 17).

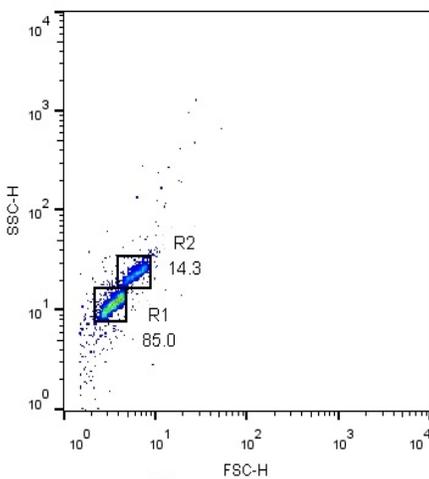


Figura 17. Dot plot de las perlas acopladas a CD63 (Invitrogen™ (10606D) donde se muestran los *gates* establecidos para el análisis de la IMF de las dos poblaciones observadas (R1 y R2).

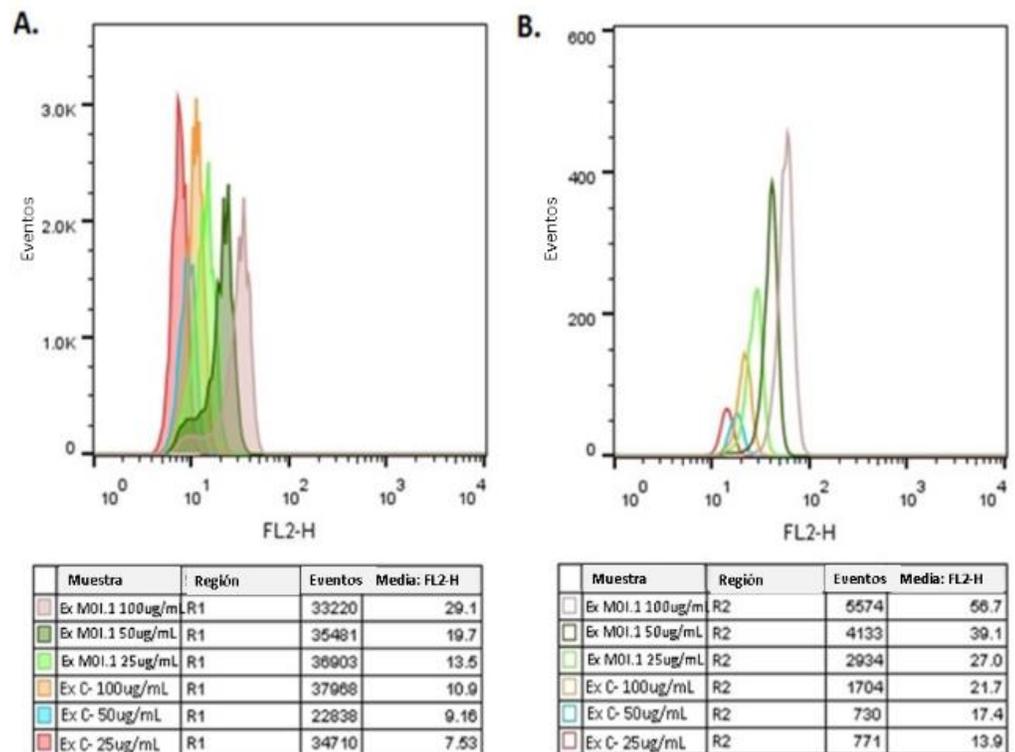


Figura 18. Histogramas de las poblaciones separadas en el citómetro de flujo, según el criterio indicado en la Fig. 17 y analizadas según la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en el canal “amarillo” FL2-H (~570 nm), que corresponde a la señal del AB CD63-PE. A. R1, complejo de las perlas unidas a los exosomas. B. R2, complejo de perlas unidas a los exosomas interaccionando entre ellas en dímeros o trímeros. Ex C- 25, 50, 100µg/mL (control negativo, exosomas derivados de monocitos sin estímulo empleando distintas concentraciones de proteína). Ex MOI.1 25, 50, 100µg/mL (exosomas derivados de monocitos infectados a MOI de 0.1, empleando distintas concentraciones de proteína). Adquisición de menos de 2x10⁴ eventos.

En la población R2, se duplica la IMF con respecto a la población R1 debido a la agregación de las perlas en dímeros o trímeros. Observamos un aumento en la IMF en los exosomas producidos por los monocitos THP-1 infectados (IMF de 56.7) en comparación con el control negativo (IMF de 21.7) de manera dependiente al incremento de la concentración de proteína añadida a las perlas CD63; tanto para la población de perlas independientes (R1) como para la población de perlas en dímeros o trímeros (R2), la cual se duplica (Fig. 18). Indicando así, que el estímulo producido por el DENV-2 en los monocitos induce un incremento en la expresión de la tetraspanina CD63 y/o un aumento en la producción de exosomas CD63 positivos en comparación a la producción basal de una célula no estimulada.

7.5 Caracterización morfológica de los exosomas derivados de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus Dengue por microscopía electrónica (obtenidos por ultracentrifugación diferencial)

Una vez confirmada la presencia de exosomas derivados de monocitos infectados con DENV-2 NGC mediante Citometría de flujo, detectando la tetraspanina CD63, se procedió a su caracterización morfológica mediante microscopía electrónica. Se analizó el pellet obtenido por ultracentrifugación diferencial del sobrenadante de un

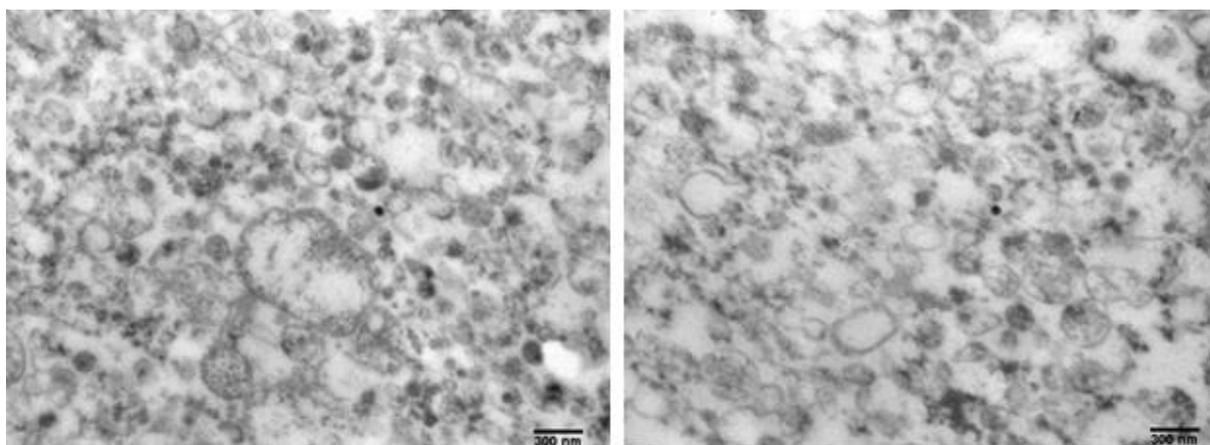


Figura 19. Vesículas extracelulares y exosomas derivados de monocitos THP-1 sin estímulo, obtenidos mediante ultracentrifugación diferencial, fijados con glutaraldehído y teñidos con tetróxido de osmio/acetato de uranilo. Microscopio de Transmisión electrónica JEOL JEM1010.

cultivo de células THP-1 sin estímulo (control negativo) y de un cultivo de células THP-1 infectadas con DENV-2 NGC a MOI 0.1 a las 72 horas post-infección. Al analizar los exosomas derivados de la línea celular THP-1 por microscopía electrónica de transmisión, se observó una población heterogénea de vesículas extracelulares, incluyendo exosomas, tanto para el control negativo (Fig. 19), como para las EVs producidas bajo el estímulo del virus Dengue (Fig. 20). No obstante, en las microscopías de las EVs derivadas de monocitos infectados, se observa una muestra más limpia y homogénea que el control negativo, con vesículas menores a los 500nm, en comparación con las vesículas producidas de manera basal por los monocitos sin estímulo, donde se observan vesículas de hasta 1µm.

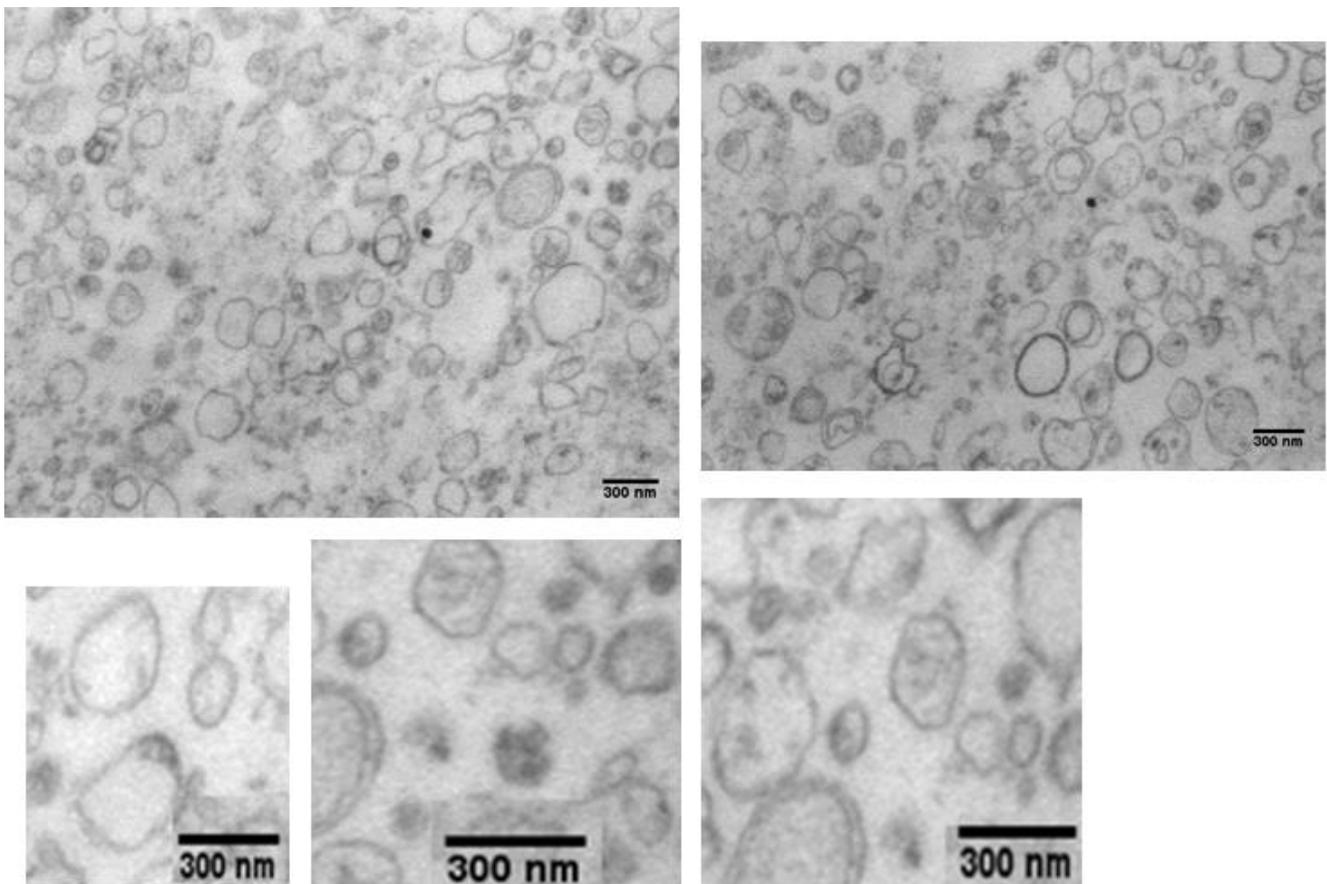


Figura 20. Vesículas extracelulares y exosomas derivados de monocitos THP-1 infectados con DENV (24hpi) a MOI 0.1, obtenidos mediante ultracentrifugación diferencial, fijados con glutaraldehído y teñidos con tetróxido de osmio/acetato de uranilo. Microscopio de Transmisión electrónica JEOL JEM1010.

7.6 Análisis por Rastreo de Nanopartículas de las EVs derivadas de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus Dengue

Habiendo confirmado por citometría de flujo la presencia del marcador exosomal CD63 y haber observado vesículas de diversos tamaños mediante la EM, se procedió a analizar las EVs obtenidas por ultracentrifugación diferencial, añadiendo una filtración de 0.22 μm con el fin de eliminar las partículas mayores observadas en la EM por Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA), en el equipo NanoSight NS300 de la Universidad Iberoamericana.

El análisis por rastreo de nanopartículas es una técnica reciente cada vez más usada por la comunidad científica para el análisis de microvesículas (Dragovic *et al.* 2011). Este sistema permite un análisis rápido de las muestras en tiempo real mediante la toma de un video, combinando la dispersión de la luz usando un microscopio de luz y la relación del movimiento browniano con el tamaño de las partículas, para así calcular el tamaño y concentración totales. Su límite de

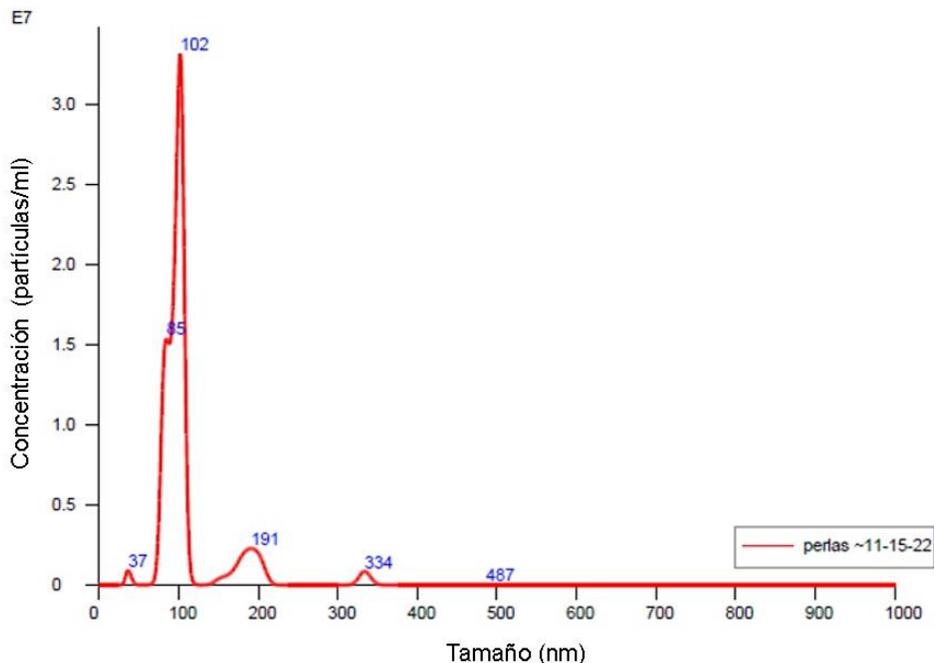


Figura 21. Gráfica mostrada en el reporte de lectura del NanoSight NS300 del análisis por NTA de perlas de poliestireno calibradas de 100 y 200 nm (dilución 1:500). Se muestran diversos picos de concentración de los tamaños predominantes, siendo los tres más representativos aquellos que se acercan al tamaño de las perlas: 85, 102 y 191 nm.

sensibilidad va de los 10 nm hasta los 1000 nm. Los parámetros de lectura del equipo fueron ajustados mediante el análisis previo de una mezcla de Nanopartículas calibradas de poliestireno de 100 y 200 nm llevadas a la dilución de lectura adecuada del NanoSight (entre 10^6 - 10^9 partículas). Con base en este control positivo de detección, se establecieron las condiciones de lectura recomendadas para partículas menores a 150 nm: un nivel de cámara de 14, umbral de detección de 2.0 (el mínimo), temperatura de 20°C, volumen de muestra de 1 mL, 30 segundos de captura de video y tres repeticiones de lectura por muestra. La lectura de la mezcla de perlas de 100 y 200 nm en concentración 1:1 mostró principalmente tres picos de concentración en los tamaños cercanos al de las perlas: 85, 102 y 191 nm. No obstante, el equipo arroja una distribución de tamaño de partículas no absoluta, sino gradual, en un rango de tamaño desde los 20 hasta los 500 nm, donde se detectan posibles perlas rotas o agregados de las mismas, dando una lectura de partículas más pequeñas a los 100nm o mayores a los 200nm, como se observa en la Fig. 21.

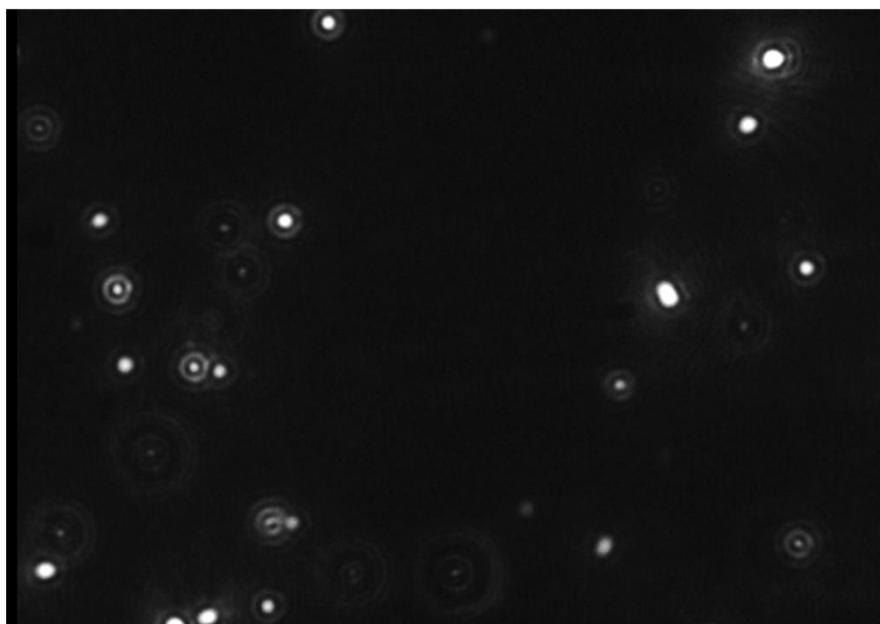


Figura 22. Captura de pantalla del video grabado desde el NanoSight NS300, que muestra el nivel de cámara óptimo para detectar la dispersión de la luz de las partículas más pequeñas presentes en las fracciones de vesículas extracelulares derivadas de monocitos, obtenidas mediante un gradiente continuo de Iodixanol.

Una vez ajustados los parámetros de adquisición, las muestras de EVs derivadas de monocitos no estimulados (*mock infected*) e infectados con el Virus Dengue, fueron resuspendidas en PBS 1X y se llevaron a la dilución de lectura adecuada del equipo (1:50) para poder detectar entre 10^6 - 10^9 partículas.

Se tomó un video de 30 segundos para cada muestra, por triplicado, donde se observa la luz dispersada de las vesículas derivadas de monocitos para cada fracción (Fig. 22). Posteriormente, mediante la aplicación de la ecuación Einstein-Stokes y el umbral mínimo de detección de partículas, el software determinó la concentración y el tamaño de cada partícula con base en el movimiento browniano detectado en el video, donde las partículas más pequeñas se mueven de manera aleatoria rápida y las partículas de mayor tamaño se mueven de manera aleatoria lenta en el medio fluido (Fig. 23 A). De igual manera, se observa en el *dot plot* del análisis del equipo, que la mayoría de las partículas detectadas son menores a los 250 nm (Fig. 23 B).

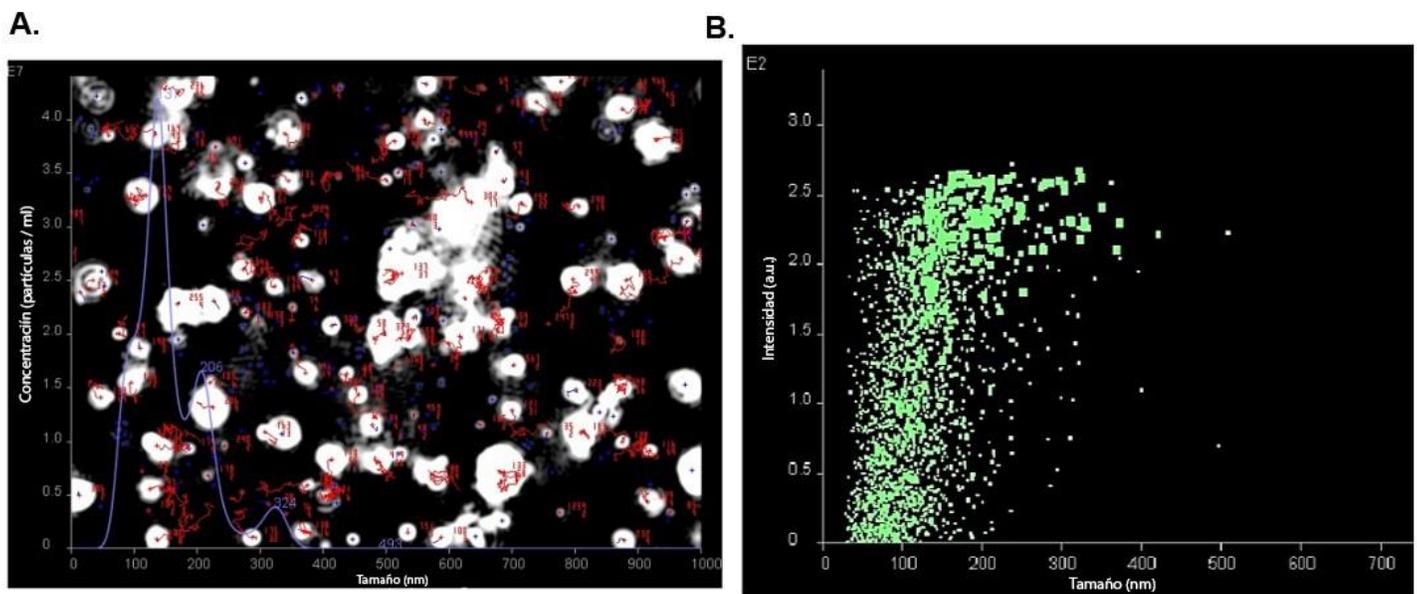


Figura 23. Captura de pantalla del análisis de las partículas detectadas por movimiento browniano y dispersión de la luz desde el NanoSight NS300. A. Análisis del tamaño de las partículas detectadas por movimiento browniano. B. *Dot plot* de las partículas detectadas de acuerdo a su tamaño y concentración, donde la mayoría son menores a los 250nm.

El NTA permitió la obtención de la concentración de partículas en función de su tamaño y se observó una muestra polidispersa tanto para el control negativo, como para las partículas obtenidas bajo estímulo del DENV-1 NGC, en el rango de tamaño de los 30 a 485 nm. Los resultados mostraron un incremento significativo en la producción de EVs derivadas de monocitos humanos THP-1 infectados con el DENV-2 NGC en comparación a la producción basal celular de EVs. Al analizar únicamente las partículas en el rango de tamaño de los exosomas (30-120 nm), se observó una proporción mayor de estas partículas en el control negativo (45.24 %) en comparación con las partículas entre 30-120 nm observadas en células sometidas al estímulo del virus, que fue de 31.94 %. No obstante, la comparación no resulta semejante en términos de proporciones o de concentración absoluta, ya que en términos cuantitativos, se producen más partículas entre 30-120 nm y de mayor tamaño bajo estímulo del DENV-2 NGC, que de manera basal (Fig. 24).

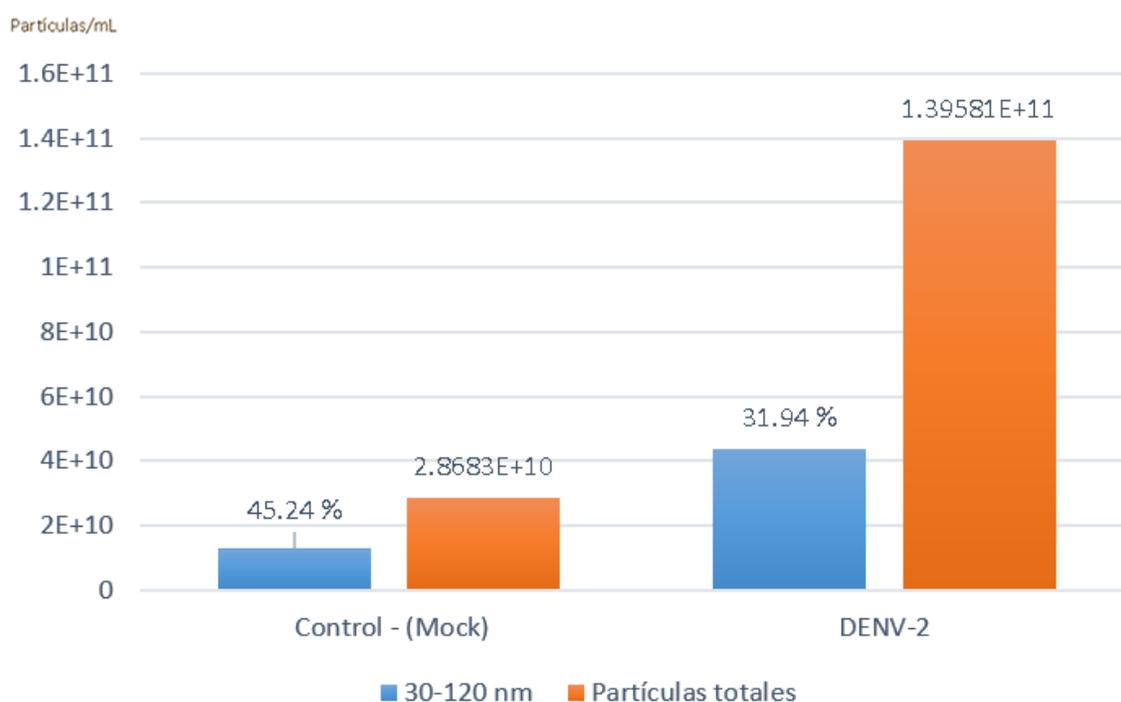


Figura 24. Determinación del tamaño de partícula y concentración por Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las EVs derivadas de monocitos sin estímulo (control negativo, *mock infected*) y de las EVs derivadas de monocitos infectados a una MOI de 0.1 con DENV-2 NGC. Se representa la concentración de las partículas de interés (el rango de tamaño en el que se encuentran los exosomas y el virus Dengue), de 30-120 nm (en azul), así como el porcentaje de esta población en comparación al total de partículas (en naranja). Se observa que bajo el estímulo del DENV-2 NGC, en general, se produce un notable incremento de EVs.

7.7 Caracterización morfológica de los exosomas derivados de monocitos humanos THP-1 infectados con el virus Dengue por microscopía electrónica (obtenidos mediante filtración)

Una vez habiéndose confirmado el incremento en la producción de EVs derivadas de monocitos bajo el efecto del virus Dengue por citometría de flujo y NTA, se realizó un segundo análisis por microscopía electrónica.

Al igual que en el análisis por NTA, se caracterizó el pellet obtenido por ultracentrifugación diferencial del sobrenadante de un cultivo de células THP-1 infectadas con DENV-2 NGC a MOI 0.1 a las 72 horas post-infección, añadiendo una filtración a través de un poro de 0.22 μm con el fin de eliminar las vesículas de mayor tamaño previamente observadas.

En efecto, se observó una población de vesículas extracelulares de menor tamaño en comparación a la muestra obtenida únicamente por ultracentrifugación diferencial, así como se visualizó una muestra más limpia (Fig. 25).

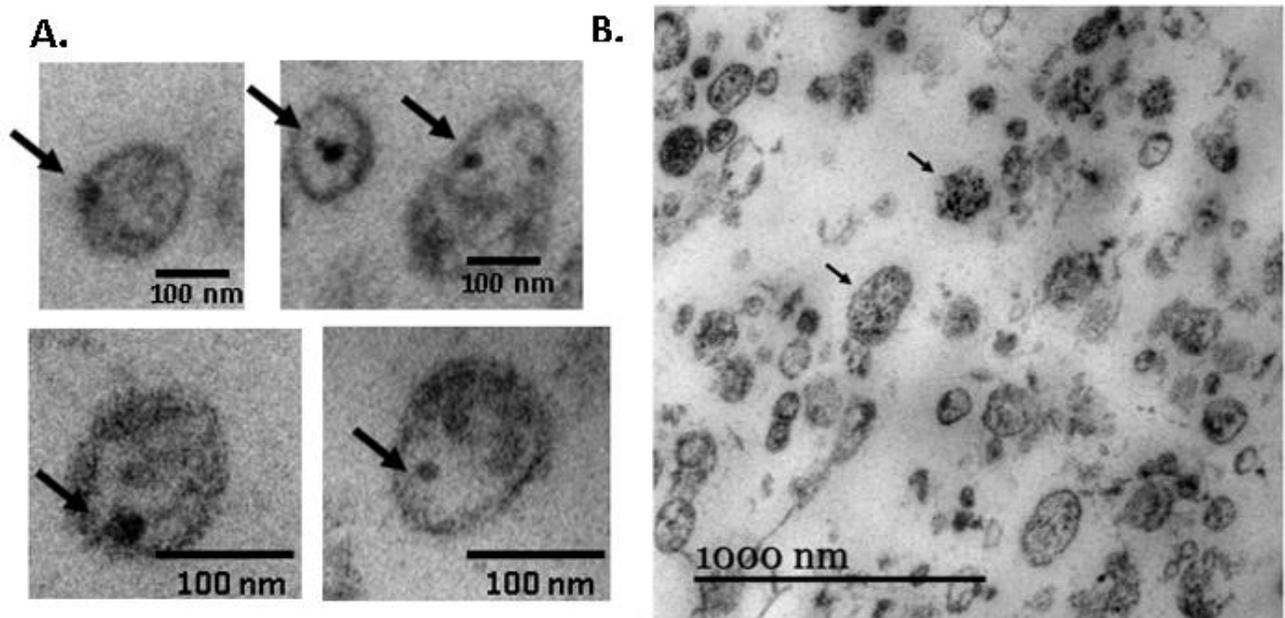


Figura 25. Vesículas extracelulares y exosomas derivados de monocitos THP-1 infectados a MOI de 0.1 con DENV-2 NGC, obtenidas mediante ultracentrifugación y posterior ultrafiltración a través de un poro de 0.22 μm . A. Se señala la presencia de partículas electrodensas dentro de una vesícula correspondiente al tamaño de un exosoma. B. Se señala la presencia de partículas electrodensas agregadas y asociadas a vesículas. Microscopio de Transmisión electrónica JEOL JEM1010.

Asimismo, al observar la mayoría de las vesículas de menor tamaño, se pudo distinguir la presencia de partículas electrodensas de distintos tamaños, como se ha observado al virus Dengue, asociadas y rodeadas por una membrana (Fig. 25 A). Las imágenes obtenidas sugieren la posibilidad de observar una partícula viral dentro de una vesícula que, por el tamaño, corresponde a un exosoma. De igual manera, se observaron partículas electrodensas agregadas, asociadas igualmente a vesículas, de mayor tamaño (Fig. 25 B).

Particularmente en el contexto de una infección viral, la convergencia de tamaño entre los virus y los exosomas dificulta su análisis, por lo que la técnica estándar para el aislamiento de exosomas a partir de un medio de cultivo estimulado con partículas infecciosas, la ultracentrifugación diferencial, resulta insuficiente para purificar ó separar virus de exosomas, incluso empleando la filtración a través de un poro de 0.22 μ m. Con base en lo anterior, posterior a la ultracentrifugación, se decidió utilizar un método de separación basado en gradientes de densidad, llamado OptiPrep™, para separar los exosomas derivados de monocitos humanos infectados con el virus Dengue, de las partículas virales que se obtienen en el pellet de la ultracentrifugación; el cual ya ha sido utilizado con éxito en la separación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana, y exosomas así como de otros virus.

En la literatura científica no existen hasta la fecha protocolos de separación de exosomas y el virus Dengue, por lo que una vez realizado el gradiente de densidad del pellet en el cual se encuentran mezclados los exosomas, las partículas virales, agregados proteicos y vesículas de otra índole, se hizo nuevamente el Análisis por rastreo de Nanopartículas para determinar el tamaño de las partículas presentes en las fracciones obtenidas, para así descartar las fracciones en las cuales no se encontraran los exosomas purificados.

7.8 Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las fracciones individuales

Una vez habiendo confirmado por citometría de flujo y TEM, la presencia de exosomas derivados de monocitos infectados con DENV-2 NGC, así como el incremento en la producción de éstos por estímulo del virus, se procedió a su separación utilizando un gradiente continuo de velocidad de Iodixanol que permitiese su separación por tamaño y densidad, puesto que la ultracentrifugación diferencial no es suficiente para separar las partículas virales del pellet obtenido, debido a la similitud en densidad de los exosomas y las partículas virales, así como el tamaño. De modo que el pellet del sobrenadante de monocitos THP-1 infectados, ultracentrifugado y filtrado, se superpuso en un gradiente continuo de 6-18% de Iodixanol y se obtuvieron 12 fracciones, que fueron analizadas de manera individual por NTA bajo las condiciones previamente mencionadas.

El NTA permitió la obtención de la concentración de partículas de acuerdo al tamaño y se observó una muestra polidispersa para cada fracción, con una distribución de tamaño de las vesículas en el rango desde los 20 nm hasta los 700 nm. Para lo cual, se analizó cada fracción en tres grupos de tamaño: de 0 nm a 29 nm, de 30 nm a 120 nm (que son las partículas que corresponden al tamaño de los exosomas) y de 121 nm a 700 nm (Fig. 26). Con base en la concentración total de partículas por muestra, se obtuvo el porcentaje de vesículas de cada grupo de tamaño, teniendo el porcentaje más elevado para el tamaño de interés, de 30-120 nm, las fracciones 5 (40.19%), 6 (25.42%), 7 (60.17%) y 11 (42.63%), como se observa en la Fig. 21. No obstante, en términos de porcentaje y concentración de partículas de determinado tamaño, para la fracción 1, a pesar de indicar 4.37% de partículas entre 30-120nm, en cuanto a concentración, es la tercer fracción en poseer más partículas de este tamaño.

Una vez observado el comportamiento de las 12 fracciones en cuanto a tamaño y concentración de partículas por el NanoSight NS300, se procedió a identificar por citometría de flujo el marcador exosomal CD63 en cada fracción.

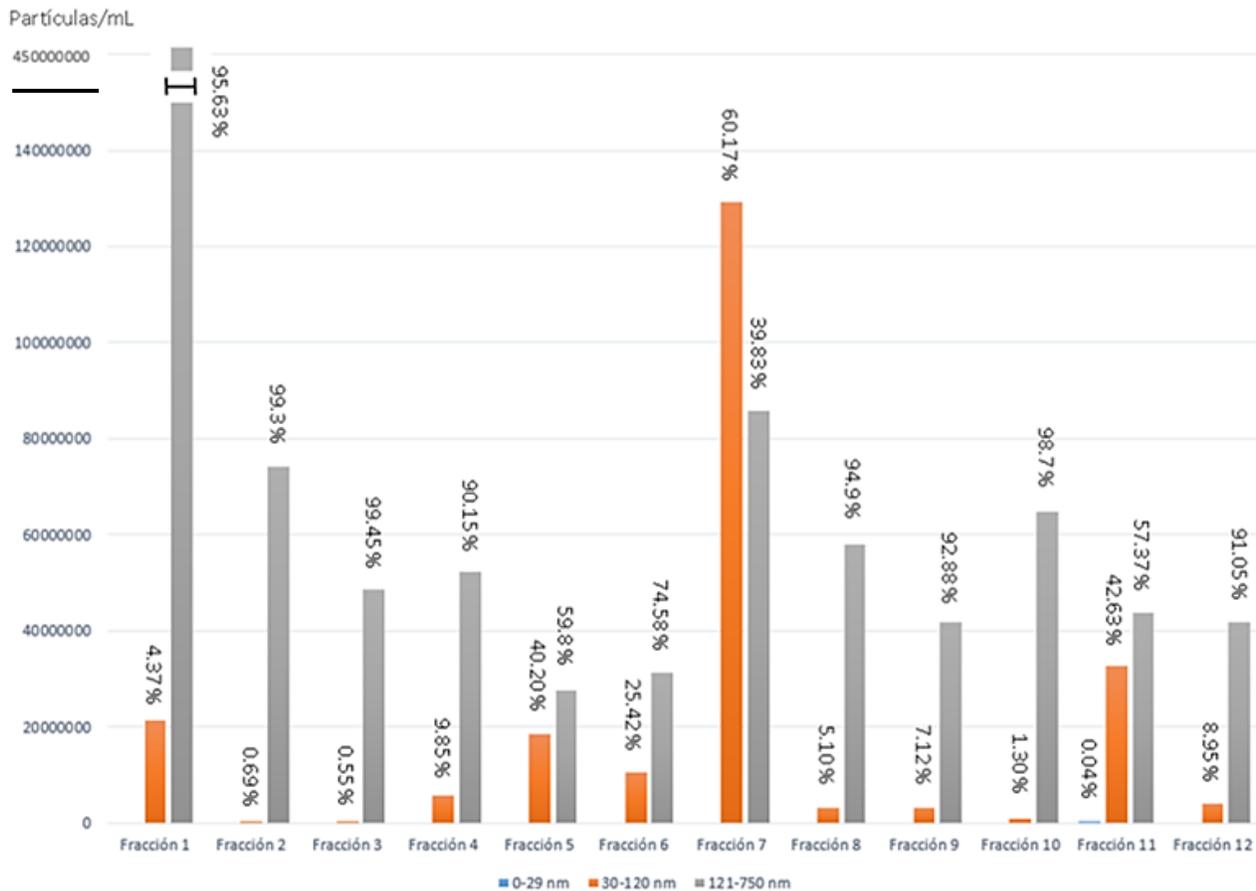


Figura 26. Determinación del tamaño de partícula y concentración por Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las fracciones individuales obtenidas por gradiente continuo de velocidad de Iodixanol. Se empleó una dilución 1:50 en el rango de concentración de 4×10^7 a 4.8×10^8 partículas/mL. Se representa la concentración de las partículas de acuerdo a tres grupos de tamaño: de 0-29 nm, de 30-120 nm (el rango de tamaño en el que se encuentran los exosomas y el virus Dengue) y de 121-750 nm; así como el porcentaje de partículas de cada grupo de tamaño con base en la concentración total de partículas por muestra. La fracción 1 es la tercer fracción con mayor concentración de partículas a pesar de no ser la más pura, de acuerdo al 95.63% de partículas que corresponden al rango de tamaño entre 121-750 nm. Las fracciones 2 y 3 poseen casi el 100% de partículas de mayor tamaño, mientras que la fracción 4 presentó un 9.85% de partículas en el rango de tamaño de los exosomas. No obstante, las fracciones 5, 6 y 7 presentan 40.20, 25.42 y 60.17% respectivamente de partículas entre 30-120 nm. Las fracciones 8, 9 y 10 presentan un porcentaje bajo de partículas del tamaño de interés y finalmente, en la fracción 11 se observa el segundo porcentaje más elevado de partículas entre 30-120 nm, con un 42.63%, seguida por el quinto porcentaje más elevado, que corresponde a la fracción 12 con un 8.95%.

Se realizó un corte en el eje del gráfico para la barra que corresponde al tamaño entre los 121-750 nm para la fracción 1 debido a la alta concentración que presenta; se muestra de lado superior izquierdo el valor real de concentración que alcanzó dicha población.

7.9 Citometría de flujo de las fracciones individuales

Las 12 fracciones obtenidas por el gradiente continuo de velocidad de Iodixanol fueron analizadas mediante Citometría de flujo utilizando perlas superparamagnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para el marcador exosomal Tetraspanina CD63 expresado en la mayoría de los exosomas humanos. Se analizó la IMF de todas las muestras por señal del Ab anti-CD63-PE.

Se establecieron dos *gates*, o regiones. R1, corresponde a la población del complejo independiente de perlas-exosomas-anticuerpo y R2, que corresponde a la población del mismo complejo de perlas pero agregadas, en dímeros o trímeros (Fig. 27).

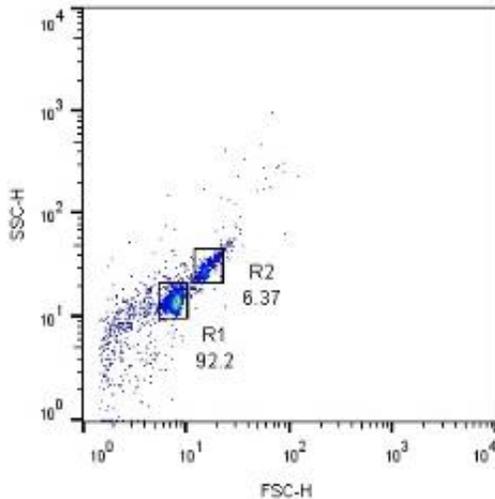


Figura 27. Dot plot de las perlas recubiertas del anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de membrana CD63 presente en la mayoría de los exosomas (Invitrogen™ (10606D), donde se muestran los *gates* establecidos para el análisis de la IMF de las dos poblaciones observadas (R1 y R2).

De acuerdo a la población R2, donde se duplica la IMF de la población R1 debido a la agregación de las perlas en dímeros o trímeros, se observó un ligero aumento en la IMF principalmente para la fracción 1, con una IMF de 29.0, la cual disminuyó a 21.4 para la fracción 2, 22.5 para la fracción 3, 18.4 para la fracción 4, 19.9 para la fracción 5, 17.1 tanto para las fracciones 6 y 7 y para las fracciones restantes la IMF disminuyó por debajo de 15.3 (Fig. 28).

Debido a que los exosomas poseen diversidad de tamaño, así como de composición, se sabe que difícilmente se encuentran de manera absoluta en una sola fracción; en vez de esto, el gradiente permite un enriquecimiento de los mismos

a lo largo de dos o más fracciones. De esta manera, con base en la literatura, los resultados por NTA y Citometría de flujo, se decidió evaluar la combinación de las fracciones 1-2 (que muestran alta concentración de partículas entre 30-120 nm, así como mayor señal de la tetraspanina CD63), las fracciones 5-6-7 (que muestran un enriquecimiento de partículas entre 30-120 nm, particularmente la fracción 7, así como un ligero incremento en la IMF para la fracción 5, seguida por la misma IMF para las fracciones 6 y 7 previo al descenso de la misma para el resto de las fracciones) y las fracciones 11-12 (que indicaron un alto porcentaje de partículas en el rango de tamaño para los exosomas en comparación al resto de las fracciones).

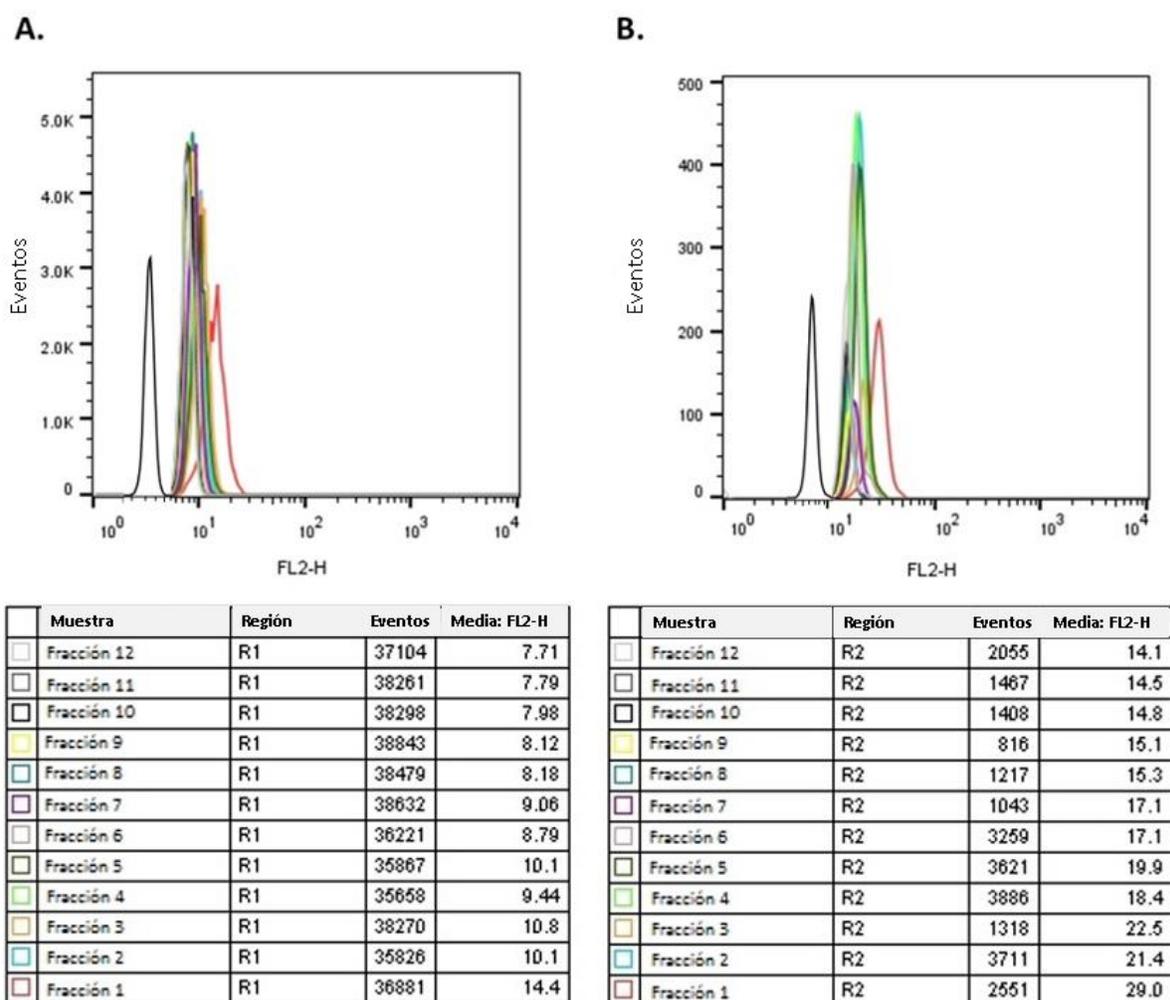


Figura 28. Histogramas de las poblaciones analizadas para las fracciones individuales. A. R1, complejo de las perlas unidas a los exosomas. B. R2, complejo de perlas unidas a los exosomas interaccionando entre ellas en dímeros o trímeros. Ex C- 25, 50, 100µg/mL (control negativo, exosomas derivados de monocitos sin estímulo empleando distintas concentraciones de proteína). Ex MOI.1 25, 50, 100µg/mL (exosomas derivados de monocitos infectados a MOI de 0.1 empleando distintas concentraciones de proteína). Adquisición de 4×10^4 eventos

La combinación de las fracciones fue evaluada nuevamente por Citometría de flujo y análisis por NTA, así como microscopía electrónica y detección del genoma viral por extracción total del RNA y amplificación del mismo por RT-PCR.

7.10 Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las fracciones combinadas (1-2, 5-6-7 y 11-12)

Con el propósito de comparar el comportamiento basal de las células en la producción y separación de vesículas extracelulares mediante gradiente de Iodixanol, y el de las células infectadas con el Virus Dengue, se incluyó un control negativo (células sin estímulo) de 20 millones de células y 20 millones de células infectadas a una MOI de 0.1 por 72 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación se cosechó el sobrenadante y se llevó a cabo la purificación de EVs por gradiente continuo de velocidad de OptiPrep™ (Iodixanol). Una vez establecidos los parámetros de lectura en el NanoSight NS300 empleando perlas de poliestireno de 100nm calibradas, se analizaron mediante NTA las Fracciones combinadas para los tratamientos mencionados: fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12.

Se evaluaron mediante NTA, utilizando una dilución adecuada para su lectura en el NanoSight (entre 10^6 - 10^9 partículas) y se tomó un video de 30 segundos por triplicado para cada muestra, observando nuevamente una muestra polidispersa para las fracciones combinadas, con una distribución de tamaño de las partículas en el rango desde los 20 nm hasta los 750 nm. Para lo cual, se analizó cada fracción en tres grupos de tamaño: de 0 nm a 29 nm, de 30 nm a 120 nm (que son las partículas que corresponden al tamaño de los exosomas) y de 121 nm a 700 nm. Se obtuvo el promedio de concentración con base en el tamaño de partícula, así como el porcentaje de partículas para cada grupo (Fig. 29 y 30).

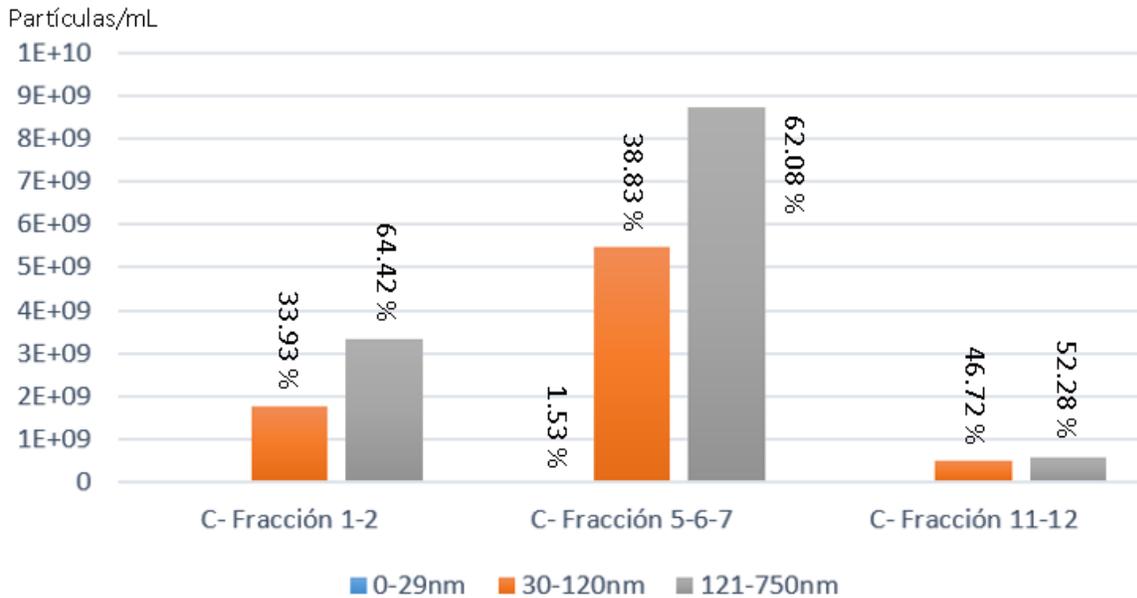


Figura 29. Determinación del tamaño de partícula y concentración por Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las fracciones combinadas obtenidas por gradiente continuo de velocidad de Iodixanol del control negativo (EVs derivadas de células sin estímulo; producción basal). Se empleó una dilución 1:50 en el rango de concentración de 2.3×10^9 a 2.2×10^{10} partículas/mL. Se representa la concentración de las partículas de acuerdo a tres grupos de tamaño: de 0-29 nm, de 30-120 nm (el rango de tamaño en el que se encuentran los exosomas y el virus Dengue) y de 121-750 nm; así como el porcentaje de partículas de cada grupo de tamaño con base en la concentración total de partículas por muestra. Las Fracciones 1-2 presentan 33.93% de partículas que corresponden al rango de tamaño de los exosomas, en cambio, las Fracciones 5-6-7 poseen casi el mismo porcentaje de partículas entre 30-120 nm (38.83%), pero mayor concentración de las mismas. Mientras que las Fracciones 11-12 presentaron 46.72% de partículas entre 30-120 nm, pero concentración más baja.

Las Fracciones 1-2 del control negativo mostraron 33.93% de partículas entre 30-120 nm, mientras que las Fracciones 1-2 obtenidas bajo el estímulo del DENV mostraron un 6.73% de partículas entre 30-120 nm; no obstante, en cuanto a concentración de partículas del tamaño de interés, las Fracciones de EVs derivadas de monocitos infectados presentan casi la misma cantidad de partículas que en el control negativo aunque la pureza sea menor. Las Fracciones 5-6-7 presentaron mayor concentración de partículas y porcentaje de partículas entre 30-120nm en el control negativo (38.83%) en comparación a las fracciones obtenidas bajo la infección con el DENV-2 (29.21%) y, por último, las Fracciones 11-12 bajo el

estímulo del virus presentaron un alto porcentaje de partículas en el tamaño de interés (82.83%) en comparación al control negativo (46.72%).

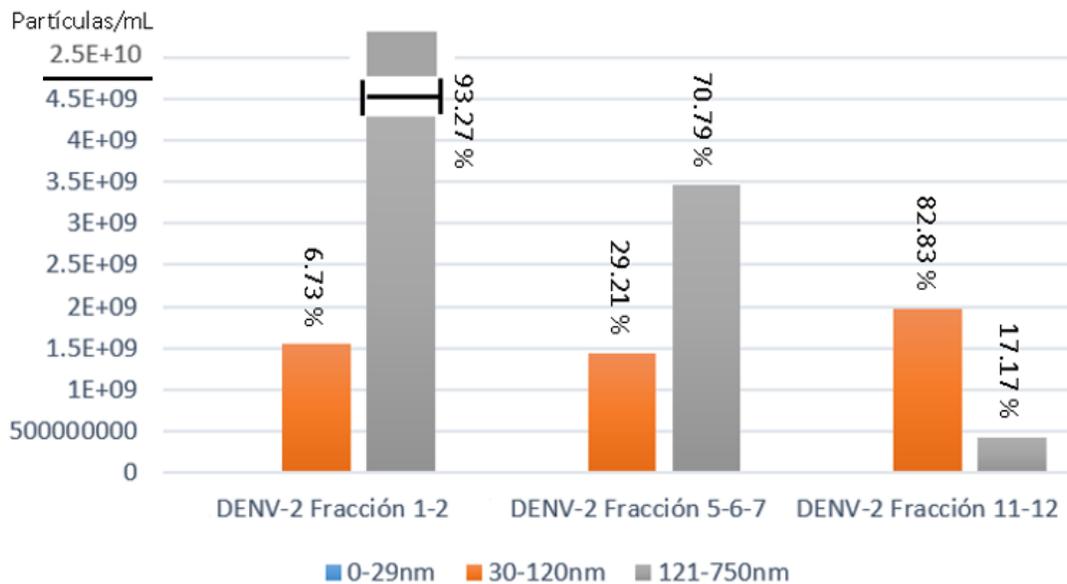


Figura 30. Determinación del tamaño de partícula y concentración por Análisis por Rastreo de Nanopartículas (NTA) de las fracciones combinadas obtenidas por gradiente continuo de velocidad de Iodixanol de las EVs derivadas de células infectadas con el DENV-s. Se empleó una dilución 1:50 en el rango de concentración de 1×10^9 a 1.4×10^{10} partículas/mL. Se representa la concentración de las partículas de acuerdo a tres grupos de tamaño: de 0-29 nm, de 30-120 nm (el rango de tamaño en el que se encuentran los exosomas y el virus Dengue) y de 121-750 nm; así como el porcentaje de partículas de cada grupo de tamaño con base en la concentración total de partículas por muestra. Las fracciones 1-2 presentan 6.73% de partículas que corresponden al rango de tamaño de los exosomas, en cambio, las fracciones 5-6-7 poseen mayor porcentaje de partículas entre 30-120 nm (29.21%), pero casi la misma concentración de las fracciones 1-2. Las fracciones 11-12 presentaron el mayor porcentaje de partículas entre 30-120 nm (82.83%), así como la concentración más alta.

Se realizó un corte en el eje del gráfico para la barra que corresponde al tamaño entre los 121-750 nm para la Fracciones 1-2 debido a la alta concentración que presentan; se muestra de lado superior izquierdo el valor real de concentración que alcanzó dicha población de partículas.

La Tabla 4 muestra los datos de concentración total de partículas en el rango de 30 a 120 nm y sus proporciones relativas en cada muestra (%).

Tabla 4. Total de partículas por mL, el total de partículas entre 30-120 nm y el porcentaje de partículas entre 30-120 nm para el NTA del control negativo (producción basal de EVs de células sin estímulo) y para el NTA del DENV-2 NGC (producción de EVs por células infectadas).

Tratamiento	Fracciones combinadas	Concentración total de partículas/mL	Concentración de partículas/mL entre 30-120 nm	Porcentaje de partículas entre 30-120 nm
Control – (Producción basal de EVs de células sin estímulo)	1-2	5151666667	1748093083	33.93 %
	5-6-7	14100000000	5476039717	38.84 %
	11-12	10860000000	507400483.3	46.72 %
DENV-2 NGC (Producción de EVs por células infectadas con DENV-2)	1-2	22950000000	1546525283	6.74 %
	5-6-7	4886666667	1427437433	29.21 %
	11-12	2386666667	1976912967	82.83 %

7.11 Citometría de flujo de las fracciones combinadas

Con el objetivo de evaluar la presencia de la tetraspanina CD63, todas las fracciones combinadas obtenidas por el gradiente continuo de velocidad de Iodixanol fueron analizadas mediante Citometría de flujo, utilizando perlas superparamagnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para la tetraspanina CD63 expresada en la mayoría de los exosomas humanos. Se analizó la IMF de todas las muestras detectando la señal del Ab CD63-PE.

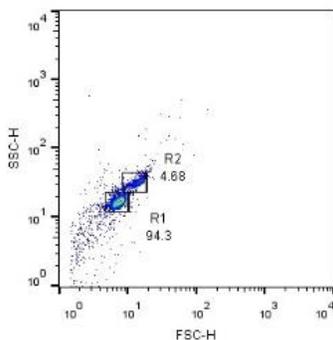


Figura 31. Dot plot de las perlas recubiertas del anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de membrana CD63 presente en la mayoría de los exosomas (Invitrogen™ (10606D), donde se muestran los *gates* establecidos para el análisis de la IMF de las dos poblaciones observadas (R1 y R2).

Se establecieron dos *gates*, R1, que corresponde a la población del complejo independiente de perlas-exosomas-anticuerpo y R2, que corresponde a la población del mismo complejo de perlas pero agregadas, en dímeros o trímeros (Fig. 31).

De acuerdo a la población R2, donde se duplica la IMF de la población R1 debido a la agregación de las perlas en dímeros o trímeros, se observó un ligero aumento en la IMF principalmente para la fracciones 1-2, con una IMF de 42.9, para las fracciones 3-4 disminuyó a 37.9; mientras que para las fracciones 5-6-7 se observó la segunda IMF más alta, siendo de 40.4. Para las fracciones 8-9-10 disminuyó a 28.0 y finalmente las fracciones 11-12 presentaron una IMF de 22.8 (Fig. 32).

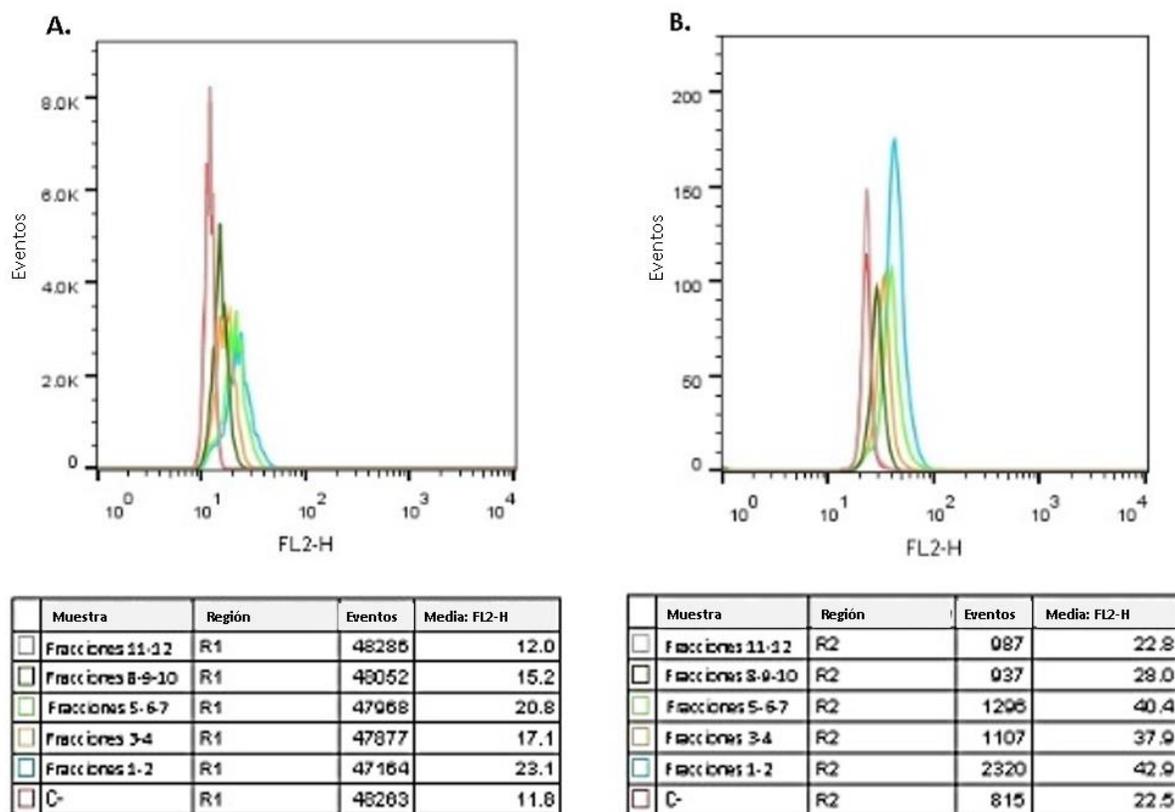


Figura 32. Histogramas de las poblaciones analizadas para todas las fracciones combinadas (1-2, 3-4, 5-6-7, 8-9-10 y 11-12). A. R1, complejo de las perlas unidas a los exosomas. B. R2, complejo de perlas unidas a los exosomas interaccionando entre ellas en dímeros o trímeros. Adquisición de 4×10^4 eventos.

7.12 Caracterización morfológica por Microscopía Electrónica (EM) de las vesículas presentes en las fracciones combinadas obtenidas por gradiente continuo de velocidad de OptiPrep™ (Iodixanol)

Una vez que observamos el enriquecimiento de exosomas derivados de monocitos infectados con DENV-2 NGC principalmente en las fracciones 1-2, así como 5-6-7 mediante Citometría de flujo, detectando la tetraspanina CD63, y con base en el tamaño de las partículas detectadas por NTA, se analizó por EM el pellet de las fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12 obtenidas posterior a la separación por el gradiente de Iodixanol.

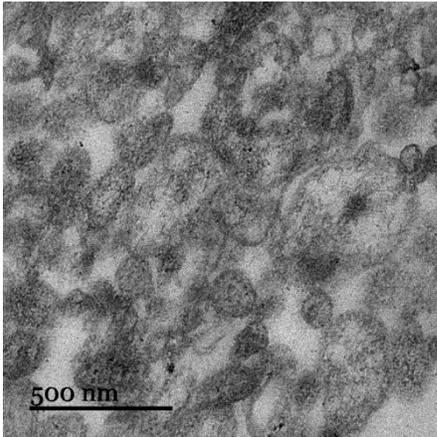


Figura 33. Vesículas extracelulares y exosomas presentes en las Fracciones 1-2, derivadas de monocitos THP-1 infectados con el DENV-2 NGC a MOI de 0.1 durante 72 horas, purificados por gradiente de velocidad de Iodixanol, fijados con glutaraldehído y teñidos con tetróxido de osmio/acetato de uranilo. Microscopio de Transmisión electrónica JEOL JEM1010. Escala de 500 nm.

Al evaluar el pellet de las Fracciones combinadas, únicamente se pudo analizar la muestra correspondiente a las Fracciones 1-2, donde se observó la morfología de vesículas previamente encontradas; no obstante, a pesar de que la muestra fue lavada con abundante PBS, se observa el contraste de color en las vesículas tratadas con Iodixanol en comparación a las imágenes previamente obtenidas. Nuevamente observamos una población heterogénea de vesículas extracelulares, de distintos tamaños (Fig. 33), incluyendo aquellas que están en el rango del tamaño de los exosomas (Fig. 34).

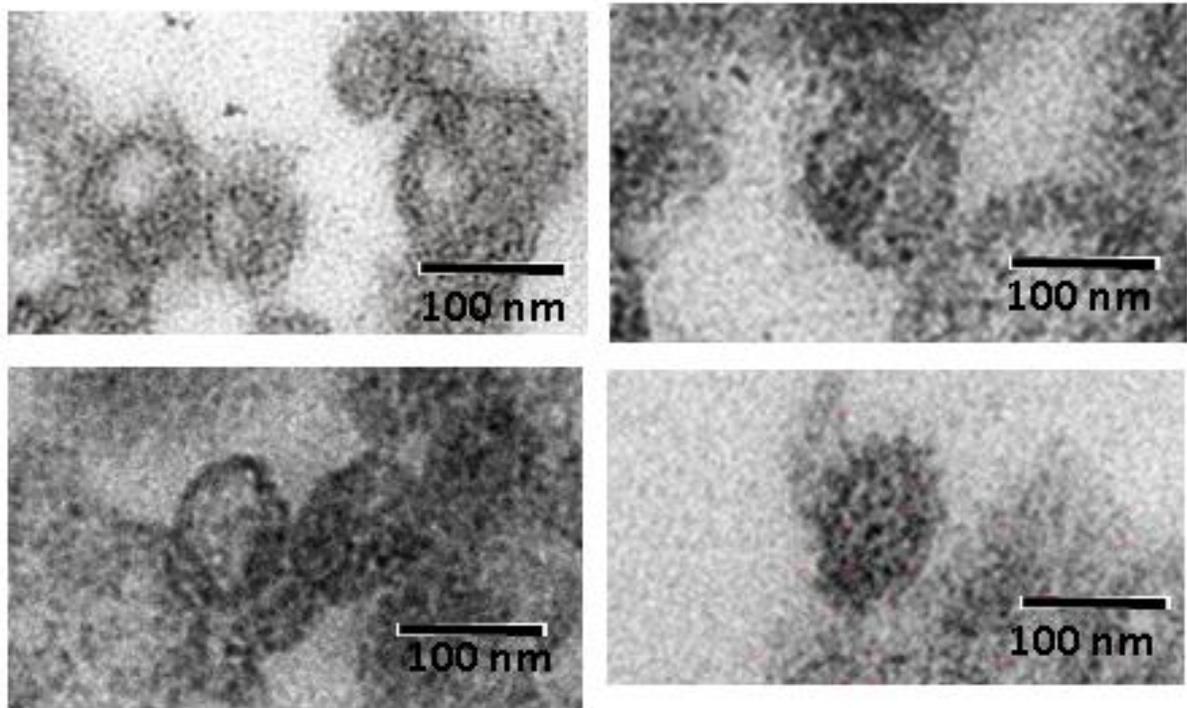


Figura 34. Aumentos en escala de 100 nm de las imágenes originales obtenidas mostradas en la Fig. 32. Se observan las vesículas que corresponden al tamaño de los exosomas, presentes en las Fracciones 1-2, derivados de monocitos THP-1 infectados con el DENV-2 NGC a MOI de 0.1 durante 72 horas, purificados por gradiente de velocidad de Iodixanol, fijados con glutaraldehído y teñidos con tetróxido de osmio/acetato de uranilo. Microscopio de Transmisión electrónica JEOL JEM1010.

7.13 Identificación del genoma viral del DENV en las Fracciones combinadas 1-2, 5-6-7 y 11-12 obtenidas por gradiente de velocidad de Iodixanol

Para determinar la posible presencia del genoma viral en las fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12, se purificó el RNA total de las mismas, se cuantificó y se llevó a cabo la reacción de RT-PCR utilizando el kit OneStep; se evaluaron los productos del RT-PCR por electroforesis en gel, que fue visualizado en el Typhoon™ FLA 9500 biomolecular imager (*Blue n.d.*). Se utilizó GAPDH como control negativo; no obstante, las condiciones de amplificación de GAPDH son distintas a las del DENV-2 NGC (Fig. 35), por lo que se evaluó en un gel distinto (Fig. 36).

Como control positivo, se evaluó el DENV-2 NGC (a partir de un stock viral) y las diferentes fracciones del gradiente de lodixanol. El fragmento de 511 pb del genoma de DENV-2 fue amplificado para el DENV del stock (control positivo) al observarse una banda de amplificación del tamaño del peso esperado. En éste, la banda que se observa mejor es la del stock viral, las fracciones 1-2 y las Fracciones 5-6-7; no obstante, de igual manera se observa una banda tenue para en las fracciones 11-12, pudiendo indicar que los exosomas pueden contener ya sea genoma viral y/o partículas virales (Fig. 35).

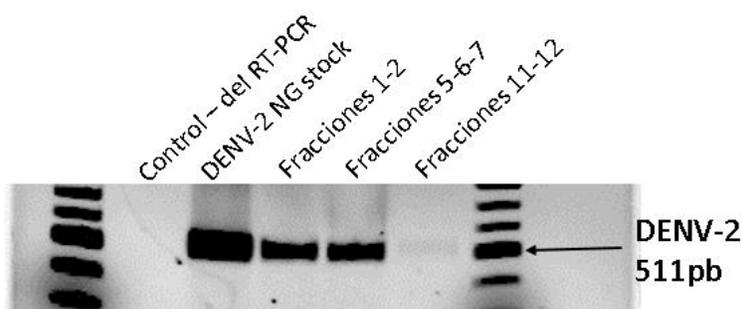
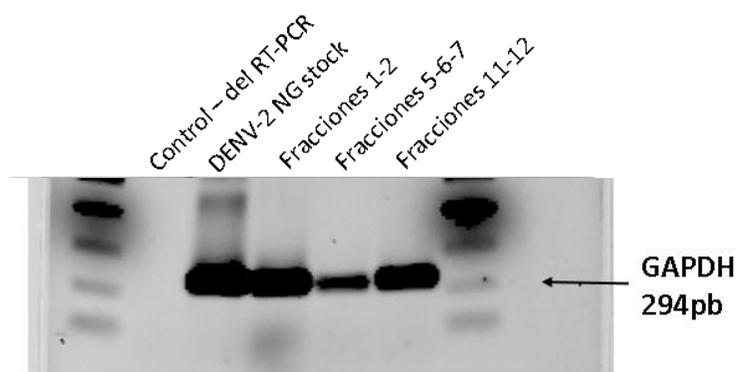


Figura 35. Resultados representativos del RT-PCR mostrando el fragmento de 511 pb del genoma de DENV-2 que fue amplificado para las EVs presentes en las Fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12 obtenidas por gradiente continuo de velocidad de lodixanol.

Figura 36. Resultados representativos del RT-PCR mostrando el fragmento de 294 pb de GAPDH que fue amplificado para las EVs presentes en las Fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12 obtenidas por gradiente continuo de velocidad de lodixanol.



7.14 Ensayo de co-cultivo

7.14.1 RT-PCR

Para determinar la posible infección favorecida por los exosomas derivados de monocitos infectados con DENV-2 NGC, se purificó el RNA celular de los co-cultivos a los 6-7 días post-estimulación:

- Monocitos THP-1 estimulados con exosomas (50 µg de proteína exosomal obtenida por gradientes de Iodixanol y cuantificada por micro BCA) de las fracciones 1-2, 5-6-7 y 11-12.
- Monocitos THP-1 infectados con DENV-2 NG.
- Monocitos THP-1 sin estímulo.

Se llevó a cabo la reacción de RT-PCR empleando el kit OneStep y se evaluaron los productos del RT-PCR por electroforesis en gel, que fue visualizado en el equipo Typhoon™ FLA 9500 biomolecular imager (Blue n.d.). Se observó una banda del tamaño del peso esperado (511pb), tanto en los monocitos THP-1 estimulados con las Fracciones 11-12, así como en el carril correspondiente al stock del DENV-2, pudiendo indicar que tanto en el stock viral (control positivo) como en los exosomas presentes en las fracciones 11-12 se estableció una infección productiva, donde pudo ser detectado el genoma viral (Fig. 37).

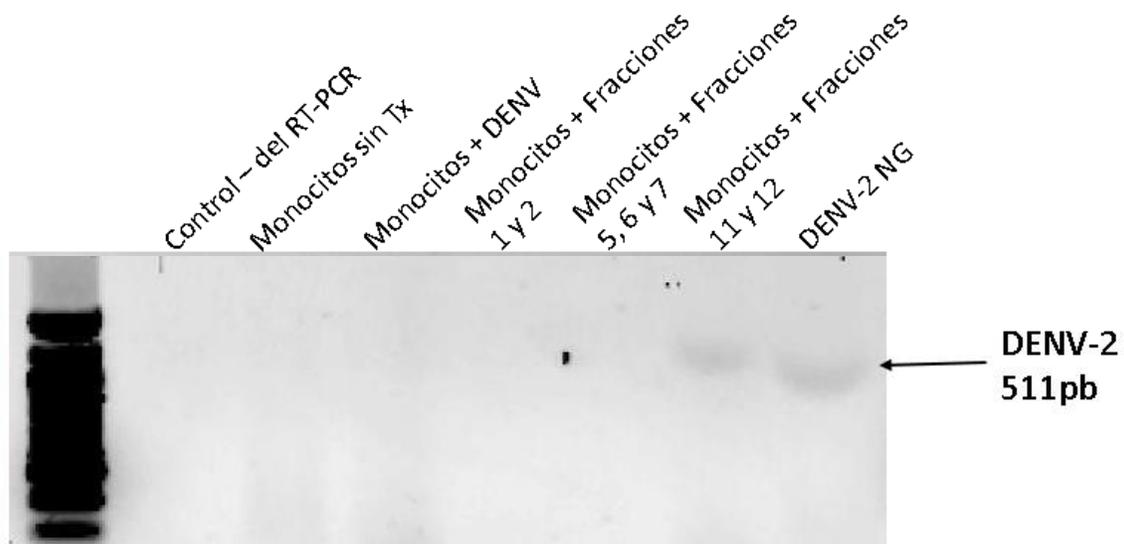


Figura 37. Resultados representativos del RT-PCR mostrando el fragmento de 511 pb del genoma de DENV-2 que fue amplificado para el co-cultivo de monocitos sin estímulo más las Fracciones combinadas 1-2, 5-6-7 o 11-12.

VIII. DISCUSIÓN

Se sabe que prácticamente todas las células secretan exosomas, entre ellas, los monocitos, los cuales son la célula diana del Virus Dengue; no obstante, hasta la fecha, son pocos los reportes relacionados al estudio de la posible participación de los exosomas en la patogénesis del dengue. Entre éstos, no existe un reporte en la literatura en donde se evalúen las EVs y/o exosomas derivados de monocitos infectados por el DENV. En el presente estudio, se utilizó la línea celular monocítica humana THP-1, la cual, se ha visto que también secreta exosomas y que éstos son positivos para distintos marcadores exosomales, como CD9, CD63, CD81, Tsg101 y Hsp70 (Ekström *et al.*, 2013).

Inicialmente se evaluaron los exosomas derivados de monocitos THP-1 infectados por el DENV-2 NGC mediante citometría de flujo, detectando la tetraspanina CD63, un marcador exosomal. Este análisis nos permitió confirmar la presencia de la tetraspanina en la muestra de EVs y exosomas derivados de monocitos THP-1 infectados con DENV-2 NGC, obtenida por ultracentrifugación diferencial. Asimismo, se observó un incremento en la presencia de la señal por CD63 en comparación a los exosomas derivados de monocitos sin estímulo (*mock infected*). Esto debido a un incremento en el número de exosomas CD63 positivos y/o en el incremento en la expresión de CD63.

Una de las técnicas esenciales en el campo de las EVs y los exosomas, es la microscopía electrónica, ya que permite visualizar la morfología de las vesículas obtenidas, así como la limpieza de la muestra empleada. Es conocido que en el pellet obtenido por ultracentrifugación diferencial, se pueden encontrar agregados proteicos, partículas virales, diversas subpoblaciones de vesículas de distintos tamaños y de probable origen endosomal y de membrana plasmática (de hasta 1 µm), así como vesículas menores a los 150 nm, que corresponden al tamaño de los exosomas (Bobrie *et al.*, 2012); de forma que al observar la muestra obtenida por ultracentrifugación diferencial, se observó una población heterogénea de vesículas, de múltiples tamaños. Con base en lo anterior, las muestras fueron posteriormente

analizadas por NTA, añadiendo una filtración a través de un poro de 0.22 μm para eliminar la mayor cantidad posible de partículas mayores de 250 nm; se logró confirmar el resultado observado por citometría de flujo, donde el Virus Dengue induce un incremento en la vesiculación celular en comparación a la producción basal de EVs (*mock infected*), que, si bien no incrementa el porcentaje de vesículas de 30 a 120 nm, sí aumenta considerablemente el número total de partículas en este rango de tamaño. No obstante, aún fue detectada (aunque en menor proporción) la presencia de partículas de mayor tamaño, como lo indicó la ultracentrifugación diferencial y como lo corroboró la segunda caracterización por microscopía electrónica, donde, aun habiendo filtrado la muestra, se observaron algunas vesículas mayores a 250 nm. No obstante, la filtración permitió observar más vesículas en el rango de tamaño de los exosomas, así como la presencia de partículas electrodensas de distintos tamaños asociadas a vesículas que, de acuerdo a la literatura, podrían corresponder a partículas virales de 50-60 nm. Mediante el marcaje específico con anticuerpos acoplados a oro coloidal contra alguna proteína estructural del virus, así como de los exosomas, se podría confirmar la presencia del virus Dengue dentro de una vesícula que, por el tamaño y forma ovoide, corresponde a un exosoma; no obstante, las imágenes sugieren el posible transporte viral mediado por EVs.

El estudio de los exosomas es un área que ha incrementado en auge a partir de la última década y cada vez más técnicas son optimizadas y desarrolladas para su análisis; pese a esto, la combinación de las investigaciones sobre virus y exosomas vuelve particularmente complicado su estudio, debido a la similitud en tamaño, composición y densidad. Para utilizar los exosomas en los ensayos biológicos propuestos en este estudio, y con base en lo anterior, se decidió emplear una técnica más precisa de separación de exosomas y partículas virales, mediante gradientes de densidad.

Se han descrito protocolos de separación basados en gradientes de sacarosa, gradientes continuos de Iodixanol (OptiPrep™) y la combinación de ambos,

logrando una buena separación de exosomas en fracciones distintas a las que se posiciona el virus.

Al no existir reportes que aseguren la separación de exosomas y el Virus Dengue, se evaluó inicialmente el protocolo seguido por Zhu *et al.*, 2015, donde mezclan el pellet obtenido por ultracentrifugación diferencial con sacarosa 2.5 M, superponen sacarosa 2 M seguido de sacarosa 0.25 M, ultracentrifugan por 16 horas a 150,000 g y finalmente colectan los exosomas acumulados en la interfase formada entre la sacarosa 0.25 M y 2 M (Zhu *et al.*, 2015). No obstante, la cantidad recuperada de muestra fue mínima y su análisis por EM no fue posible, ya que al ser una solución hiperosmótica y viscosa, conduce a una tasa de sedimentación muy lenta para las partículas pequeñas y resulta sumamente difícil retirarla.

Cantin *et al.*, en 2008, reportan en su estudio, sobre la separación de exosomas y HIV-1 a partir de sobrenadante libre de células, que la sacarosa resulta ineficiente en la separación de los mismos y sugieren el uso de gradientes de Iodixanol (Cantin *et al.*, 2008). El Iodixanol (OptiPrep™) fue desarrollado como un medio de contraste dimérico, isosmótico, no iónico, hidrosoluble y no tóxico para las células; se encuentra al 60% en agua, es poco viscoso y debido a su masa molecular, forma autogradientes fácilmente, permitiendo el adecuado aislamiento de células, organelos, purificación viral y aislamiento de lipoproteínas y macromoléculas (AS, 2011; Ford *et al.*, 1994).

Konadu *et al.*, en 2016, utilizaron un gradiente de velocidad de Iodixanol del 6 al 18% para aislar exosomas del plasma de pacientes infectados con HIV-1. De las 12 fracciones que obtuvieron, encontraron que los exosomas se segregaron en las fracciones de baja densidad; es decir, en las fracciones superiores del gradiente de Iodixanol, mientras que las partículas virales se encontraron en las fracciones de alta densidad (en las fracciones inferiores). Identificaron las partículas virales mediante ensayo de ELISA detectando la proteína de la cápside p24 del HIV-1, mientras que los exosomas fueron identificados mediante la determinación de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE) y por western blot de los marcadores CD9, CD63 y CD45. Las fracciones superiores colectadas (1, 2, 3)

contenían exosomas, dando negativo para la contaminación de la proteína p24 del HIV-1. Eligieron las fracciones 2 y 3 para el uso de los exosomas en los ensayos de funcionalidad posteriores y determinaron la presencia del virus en las fracciones 11 y 12; no obstante, la detección de CD63 para los exosomas decreció de manera evidente hasta las fracciones 7 y 8, mientras que p24 fue detectado desde la fracción 9 hasta la 12. De modo que se observa, tanto para los exosomas como para el HIV-1, una separación progresiva, siendo más que una purificación, un enriquecimiento gradual de ambos con base en las concentraciones de Iodixanol. La separación eficiente de exosomas de las partículas virales, al emplear únicamente las fracciones 2 y 3, les permitió el uso preciso de éstos en ensayos biológicos con el fin de estudiar el posible papel de los exosomas, como moduladores inmunológicos en la patogenia del HIV-1 (Konadu *et al.*, 2016). Por otro lado, Sampey *et al.*, en 2014, en un trabajo de revisión sobre los exosomas y su papel en las infecciones virales del sistema nervioso central, sugieren, en la representación gráfica de los resultados, que el posicionamiento de los exosomas, empleando igualmente un gradiente del 6 al 18% de Iodixanol, ocurre principalmente en las fracciones 5, 6 y 7 (correspondientes al 10.8, 12 y 13.2% de Iodixanol), mientras que los virus se localizarían aproximadamente en las fracciones 9 y 10 (correspondientes al 15.6 y 16.8% de Iodixanol) y finalmente en la fracción 11 (18% de Iodixanol), cuerpos apoptóticos (Sampey *et al.*, 2014a). Cantin *et al.*, en 2008, empleó asimismo un gradiente de separación del 6 al 18% de Iodixanol para separar al HIV-1 del sobrenadante celular, encontrando que en las primeras fracciones se localizaban vesículas grandes correspondientes al tamaño de las micropartículas, mientras que la distribución de los exosomas a lo largo de las fracciones del gradiente se dio principalmente en las fracciones 3, 4, 5 y 6 (correspondientes al 8.4, 9.6, 10.8 y 12% de Iodixanol) y el virus se localizó en la fracción 9 (15.6 % de Iodixanol; Cantin *et al.*, 2008).

La mayoría de los protocolos estandarizados para la separación de virus y exosomas por gradiente, son para HIV-1. No obstante, Z. Liu, Zhang, Yu, & He, en 2014, emplearon un gradiente de Iodixanol del 6 al 24% basado en el protocolo empleado por Cantin *et al.*, en el 2008, para separar exosomas de HCV del plasma

de pacientes infectados, así como de sobrenadante de cultivo celular el cual tiene un tamaño de 50-65 nm y una densidad >1.13 g/ml; colectaron 11 fracciones y encontraron un enriquecimiento en exosomas distribuido a lo largo de las fracciones 2-4 principalmente, mientras que el virus se localizó en las fracciones 7-10 (Liu *et al.*, 2014) .

El DENV posee una densidad de 1.18 a 1.22 g/mL en gradientes de sacarosa y un tamaño aproximado de 50 nm (Kuhn, 2002; Liu *et al.*, 1991), mientras que los exosomas poseen una densidad de 1.13 a 1.19 g/mL y, de acuerdo a diversos autores, un rango de tamaño desde los 30-50 nm hasta los 100-150 nm (en esta investigación se empleó un tamaño de 30-120nm; Théry *et al.*, 2009; Vlassov *et al.*, 2012); no obstante, al no existir reportes previos de separación por Iodixanol y, tomando en cuenta que los exosomas derivados de cada estirpe celular bajo determinado estímulo, son distintos en composición y tamaño, para este estudio se decidió evaluar el gradiente de velocidad de Iodixanol del 6 al 18% propuesto por Konadu *et al.*, en 2016, aunque, en cuanto a tamaño y en términos de filogenia, el DENV se asemeja más al HCV que al HIV.

La evaluación de las fracciones obtenidas en la estandarización del gradiente de velocidad de Iodixanol del 6-18%, dio un patrón de distribución en la señal por CD63 en disminución gradual a partir de las primeras fracciones, mientras que las partículas en el rango de tamaño de los exosomas, fueron encontradas en todas las fracciones mediante NTA. Con base en los resultados y en los reportes previos de la literatura, se decidió evaluar la unión de las fracciones 1-2 (por mayor señal de CD63 y menor densidad de Iodixanol), 5-6-7 (por mayor pureza en cuanto tamaño de partículas entre 30-120 nm y señal aún detectable de CD63) y 11-12. Una vez analizada la combinación de las fracciones, se obtuvo mayor señal por CD63 para las fracciones 1-2, así como fueron las únicas fracciones que mostraron una morfología vesicular en el rango del tamaño de los exosomas mediante EM; de igual manera, se mantuvo un porcentaje bajo en cuanto a pureza de partículas entre 30-120 nm para el NTA en comparación a las fracciones individuales, aunque en alta concentración.

Al ser las fracciones 1 y 2 las de menor densidad, se sugiere que haya un enriquecimiento de exosomas en las mismas y que éstos se distribuyan a lo largo de las fracciones 3, 4, 5, 6 y 7 al ser también detectada la presencia de la tetraspanina CD63.

De acuerdo a Konadu *et al.*, 2016, la separación de exosomas por gradientes de iodixanol tiene ciertas dificultades y limitaciones. Entre ellas, cabe destacar la enorme cantidad de muestra que es perdida (cerca del 96% de los exosomas de partida), durante el proceso. Aunado a que el procedimiento requiere de mucho tiempo, acceso a equipo costoso y por último, la generación de los gradientes de iodixanol empleando un sistema formador de gradientes requiere considerable práctica para asegurar la reproducibilidad de los ensayos. De esta manera, entre las variables del procedimiento, se encuentran la escasa cantidad de proteína cuantificada por microBCA, la cual es directamente proporcional a la disminución en la IMF de la Citometría de flujo. Aunado a esto, no se tienen datos acerca de la saturabilidad del gradiente, por lo que, de acuerdo a los requerimientos de cada técnica, se partió de un mayor o menor número de células con el fin de incrementar el rendimiento final, así como distinto número de gradientes. En cuanto a la caracterización de los exosomas, mientras que para la Citometría de flujo empleando perlas magnéticas, se buscaba una concentración proteínas de 100 µg/mL mediante microBCA, la microscopía requería un criterio visible del pellet, para el correcto procesamiento de la muestra al realizar los cortes ultra finos en el ultramicrotomo; el NanoSight resultó mucho más sensible, cuantificando una gran cantidad de partículas por mL. En términos de identificación del genoma viral en las fracciones combinadas, por purificación, cuantificación de RNA y amplificación por RT-PCR, así como en la obtención de muestra para realizar los ensayos de funcionalidad en el co-cultivo, se emplearon grandes cantidades de células para obtener poca cantidad de RNA exosomal, 50 µg/mL de proteína exosomal de las fracciones para estimular 250 millones de células y finalmente aislar el RNA celular para determinar la posible infección mediada por exosomas.

Con base en las dificultades técnicas mencionadas, el análisis por NTA resultó distinto en comparación al de las fracciones individuales, particularmente para las fracciones 5, 6 y 7, que previamente mostraban alto porcentaje de concentración de partículas entre 30-120 nm, y para las fracciones 11 y 12, que obtuvieron la mayor pureza y concentración de partículas del tamaño de interés. Con respecto a la identificación del genoma del DENV en las fracciones, éste se detectó principalmente en las fracciones 1-2 y 5-6-7; mientras que en las fracciones 11-12 se observó una banda tenue parecida a la del Stock viral. De este modo, los resultados de la identificación del genoma viral en las fracciones, sugieren que pudiese haber una asociación del DENV con los exosomas detectados en las fracciones 1-2 y 5-6-7, ya sea que estén asociados a partículas virales completas (como exosomas “troyanos”), defectuosas o únicamente al genoma viral; asimismo, se detectó genoma viral en las Fracciones 11-12, donde no se observó aumento en la IMF al evaluar la tetraspanina CD63 y cuyo análisis por NTA resultó en la mayor cantidad de partículas menores a 120 nm. Al realizar el co-cultivo para determinar la posible infección mediada por los exosomas presentes en dichas fracciones, el genoma del DENV fue detectado en las células tratadas con las fracciones 11-12. Aunque en estas mismas fracciones previamente se había detectado una mínima cantidad de genoma viral, éste fue capaz de transmitirse a los monocitos 6-7 días post-infección, lo cual probablemente indica que la escasa presencia de partículas virales en el ensayo de purificación de RNA de las fracciones, fue suficiente para que se replicase el genoma viral, en combinación con el establecimiento de las condiciones propicias (días post-infección, partículas virales infectivas); lo cual, no se observó para el resto de los tratamientos.

Los resultados obtenidos sugieren que el Virus Dengue induce un incremento en el número de vesículas extracelulares y exosomas derivados de monocitos, así como la alteración en la distribución del tamaño de los exosomas en el gradiente de lodixanol; lo cual, es un efecto contrario al que observan Z. Liu *et al.*, en 2014, donde el HCV no alteró la secreción de exosomas por los hepatocitos ni su distribución a lo largo del gradiente. De modo que la infección por DENV-2 NGC resulta en cambios significativos en la secreción de exosomas por los monocitos THP-1. De

igual manera, se propone una asociación del genoma viral del DENV-2 NGC con los exosomas de monocitos THP-1 infectados; sin embargo, se debe dilucidar la naturaleza de esta asociación, ya sea que el genoma viral resida dentro de una fracción de los exosomas, los viriones completos o que éstos estén asociados a la membrana exosomal. Ramakrishnaiah *et al.* (2013), reportaron que los exosomas asociados al Flavivirus HCV son capaces de transmitir al virus y establecer una infección productiva en células no infectadas, de manera similar a la infección producida por las partículas virales libres (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013); no obstante, Liu *et al.* (2014), observaron que, si bien la infección del HCV dentro de los exosomas resulta en una infección exitosa, es cerca de diez veces menor a la infectividad de las partículas virales libres al exhibir menor especificidad infectiva (Liu *et al.*, 2014).

El papel que juegan los exosomas en el caso de la infección por HCV y HAV es paradójico, ya que se ha visto que pueden activar al sistema inmune a través de las células dendríticas plasmacitoides y estimular la producción del Interferón de tipo I o, por el contrario, evadir la respuesta inmune mediada por anticuerpos al encubrir el RNA viral o las partículas virales completas (Longatti, 2015). Feng *et al.* (2013), reportaron que en el caso del HAV, los exosomas impiden la clarificación viral, ya que el virus asociado a los exosomas, es la forma predominante en sangre de pacientes y chimpancés infectados, mientras que la partícula viral clásica, predomina en las heces (Feng *et al.*, 2013). Por otro lado, Longatti *et al.* (2015), observaron que es posible que los exosomas funcionen como un reservorio que proteja al HCV de la respuesta inmune y que éstos permiten que el virus persista después del tratamiento antiviral y del trasplante de hígado, lo cual conduce a la característica inflamación sostenida del hígado durante la infección, producida por la inducción del Interferón de tipo I y III, así como a la abundancia de células dendríticas plasmacitoides (Longatti *et al.*, 2015).

Se conoce que la presencia del genoma del DENV-2 es suficiente para establecer una infección productiva; de forma que de acuerdo a los hallazgos experimentales del presente trabajo, se propone una posible participación de los exosomas en el

proceso infeccioso y posiblemente en la evasión de la respuesta inmune, ya que tanto las proteínas estructurales o el RNA viral, pueden formar parte del estímulo inmunológico sostenido con una la respuesta inmune exacerbada que se presenta en los casos de Dengue Severo, estimulando la citotoxicidad celular y la transducción de señales, fomentando el incremento de la producción de citocinas pro-inflamatorias, proteínas de fase aguda y/o factores de coagulación. Así como en las complicaciones asociadas particularmente a algunos serotipos (DENV-2) y aislados virales, en cuanto su virulencia y las distintas rutas de entrada viral, o en la clarificación e incremento del título viral; de forma que, al igual que en la infección por HCV, la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos se vea obstaculizada al neutralizar al virus Dengue. No obstante, las implicaciones fisiopatológicas aún son desconocidas.

VII. CONCLUSIONES

La participación de las vesículas extracelulares, concretamente de los exosomas, en el contexto de la patogénesis viral, resulta relevante y novedoso por el papel dual que éstas vesículas pueden desempeñar, ya sea que participen como un mecanismo de defensa, al activar la inmunidad innata a pesar de las estrategias virales para bloquear estas vías en las células infectadas, o que los virus empleen a los exosomas para persistir y propagar la infección sin ser detectados por la respuesta inmune del hospedero. No obstante, su estudio es complicado debido a la similitud en tamaño, densidad y características de sedimentación. En el presente estudio, utilizamos un gradiente continuo de velocidad de Iodixanol del 6-18 % para separar a los exosomas de las partículas virales. Esta separación nos permitió observar el incremento en la producción de vesículas extracelulares y exosomas derivados de monocitos humanos THP-1 infectados por el virus Dengue. Esto, aunado a la detección del genoma viral en las fracciones enriquecidas en exosomas, sugiere que estas vesículas pueden estar participando como un mecanismo alternativo de infección mediante la generación de exosomas troianos generados durante la infección de células diana (monocitos) por DENV-2.

El análisis por rastreo de nanopartículas, que permite la obtención del tamaño y concentración de partículas nanométricas, muestra que, si bien la separación de exosomas y partículas virales mediante dicha técnica, presenta limitantes metodológicas que no permiten la separación específica de los exosomas y del virus, sí hay un enriquecimiento gradual de exosomas en las fracciones menos densas del gradiente; esto se confirmó mediante la detección de la tetraspanina CD63 por citometría de flujo y la confirmación visual de la presencia de vesículas en el rango de tamaño de los exosomas por microscopía electrónica. Lo cual, es consistente con los reportes previos de separación exosomal de partículas virales mediante gradientes de Iodixanol.

Con base en los datos obtenidos, se propone por primera vez en la literatura, la existencia de exosomas “troyanos” derivados de monocitos humanos durante la infección por el Virus Dengue. Este mecanismo alternativo de infección viral ya ha sido documentado para otro miembro de la familia de los *Flavivirus*, como es HCV; en el caso de la infección por DENV, la presencia de partículas troyanas permitiría explicar la escasa clarificación viral que se reporta en los casos de pacientes que progresan a las formas graves de la enfermedad, siendo un mecanismo etiopatogénico importante en el Dengue Severo. No obstante, este hallazgo requiere de otros estudios para evaluar el papel que pudiesen tener los exosomas tanto en la posible evasión inmune, como en la persistencia y dispersión viral a células no infectadas.

VIII. PERSPECTIVAS

Determinar la naturaleza de la asociación del DENV-2 NGC con los exosomas (ya sea que el virus se localice dentro o fuera de las microvesículas), así como determinar el contenido y composición de los exosomas generados en el contexto de la infección por DENV de monocitos humanos y establecer las condiciones de posible infección mediada por los exosomas DENV positivos; lo cual, se llevará a cabo mediante la detección de proteínas virales por microscopía electrónica, utilizando anticuerpos anti-tetraspanina CD63 y/o anti-E del DENV-2 acoplados a oro coloidal y finalmente, empleando espectrometría de masas y una cinética de tiempo y concentración de estimulación de monocitos con los exosomas producidos bajo la infección con el virus Dengue.

Asimismo, nos proponemos evaluar la identificación de otros marcadores exosomales, así como de proteínas estructurales del virus, para incrementar el enriquecimiento de los exosomas (mediante ensayos de Western-Blot, determinando así la eficiencia de separación del gradiente en concentraciones del 6-18%). Asimismo, se evaluará el uso de diferentes concentraciones de Iodixanol (6-24%), para determinar las mejores condiciones de separación, evaluando la densidad de las fracciones obtenidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, E.G., V. Castilla, and E.B. Damonte. 2009. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular Microbiology*. 11:1533-1549.
- Acosta, E.G., A. Kumar, and R. Bartenschlager. 2014. Revisiting dengue virus-host cell interaction: New insights into molecular and cellular virology. *Advances in Virus Research*. 88:1-109.
- Alenquer, M., and M. Amorim. 2015. Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses*. 7:5066-5083.
- Andreu, Z., and M. Yáñez-Mó. 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in immunology*. 5:442.
- Appanna, R., S.M. Wang, S.A. Ponnampalavanar, L.C.S. Lum, and S.D. Sekaran. 2012. Cytokine factors present in dengue patient sera induces alterations of junctional proteins in human endothelial cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 87:936-942.
- Arenaccio, C., S. Anticoli, F. Manfredi, C. Chiozzini, E. Olivetta, and M. Federico. 2015. Latent HIV-1 is activated by exosomes from cells infected with either replication-competent or defective HIV-1. *Retrovirology*. 12:87.
- Arenaccio, C., C. Chiozzini, S. Columba-Cabezas, F. Manfredi, E. Affabris, A. Baur, and M. Federico. 2014. Exosomes from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells license quiescent CD4+ T lymphocytes to replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-dependent mechanism. *Journal of virology*. 88:11529-11539.
- AS, A.-S.P. 2011. Leaflet: "OptiPrep™ The ideal density gradient medium".2.
- Aupeix, K., B. Hugel, T. Martin, P. Bischoff, H. Lill, J.L. Pasquali, and J.M. Freyssinet. 1997. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *Journal of Clinical Investigation*. 99:1546-1554.
- Avirutnan, P., P. Malasit, B. Seliger, S. Bhakdi, and M. Husmann. 1998. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 161:6338-6346.
- Babst, M. 2011. MVB Vesicle Formation: ESCRT-Dependent, ESCRT-Independent and Everything in Between. *Current opinion in cell biology*. 23:452-457.
- Bache, K.G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark. 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *Journal of Cell Biology*. 162:435-442.
- Bailer, R.T., B. Lee, and L.J. Montaner. 2000. IL-13 and TNF-?? inhibit dual-tropic HIV-1 in primary macrophages by reduction of surface expression of CD4, chemokine receptors CCR5, CXCR4 and post-entry viral gene expression. *European Journal of Immunology*. 30:1340-1349.
- Barr, S.D., J.R. Smiley, and F.D. Bushman. 2008. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathogens*. 4.

- Basu, A., and U.C. Chaturvedi. 2008. Vascular endothelium: The battlefield of dengue viruses. *In FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Vol. 53. 287-299.
- Berdichevski, F., and E. Odintsova. 2007. Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *In Traffic*. Vol. 8. 89-96.
- Bernard, M.A., H. Zhao, S.C. Yue, A. Anandaiah, H. Koziel, and S.D. Tachado. 2014. Novel HIV-1 MiRNAs stimulate TNF α release in human macrophages via TLR8 signaling pathway. *PLoS ONE*. 9.
- Bhatt, S., P.W. Gething, O.J. Brady, J.P. Messina, A.W. Farlow, C.L. Moyes, J.M. Drake, J.S. Brownstein, A.G. Hoen, M.F. Myers, D.B. George, T. Jaenisch, and G.R. William. 2013. The global distribution and burden of dengue. 496:504-507.
- Bobrie, A., M. Colombo, S. Krumeich, G. Raposo, and C. Théry. 2012. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*. 1:1-11.
- Bruce, E.A., P. Digard, and A.D. Stuart. 2010. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *Journal of Virology*. 84:5848-5859.
- Buschow, S.I., E.N.M. Nolte-'t Hoen, G. van Niel, M.S. Pols, T. ten Broeke, M. Lauwen, F. Ossendorp, C.J.M. Melief, G. Raposo, R. Wubbolts, M.H.M. Wauben, and W. Stoorvogel. 2009. MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*. 10:1528-1542.
- Cai, H., K. Reinisch, and S. Ferro-Novick. 2007. Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *In Developmental Cell*. Vol. 12. 671-682.
- Canitano, A., G. Venturi, M. Borghi, M.G. Ammendolia, and S. Fais. 2013. Exosomes released in vitro from Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells contain EBV-encoded latent phase mRNAs. *Cancer Letters*. 337:193-199.
- Cantin, R., J. Diou, D. Bélanger, A.M. Tremblay, and C. Gilbert. 2008. Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *In Journal of Immunological Methods*. Vol. 338. 21-30.
- Clark, K.B., H.M. Hsiao, S. Noisakran, J.J. Tsai, and G.C. Perng. 2012. Role of microparticles in dengue virus infection and its impact on medical intervention strategies. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 85:3-18.
- Clayton, A., A. Turkes, S. Dewitt, R. Steadman, M.D. Mason, and M.B. Hallett. 2004. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18:977-979.
- Clyde, K., and E. Harris. 2006. RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selecti. *Journal of virology*. 80:2170-2182.
- Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L.F. Moita, C. Théry, and G. Raposo. 2013. Analysis of ESCRT functions in

- exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*.
- Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:255-289.
- Conde-Vancells, J., E. Rodriguez-Suarez, N. Embade, D. Gil, R. Matthiesen, M. Valle, F. Elortza, S.C. Lu, J.M. Mato, and J.M. Falcon-Perez. 2008. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of Proteome Research.* 7:5157-5166.
- Corrado, C., S. Raimondo, A. Chiesi, F. Ciccia, G. De Leo, and R. Alessandro. 2013. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences.* 14:5338-5366.
- Chahar, H., X. Bao, and A. Casola. 2015. Exosomes and Their Role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses. *Viruses.* 7:3204-3225.
- Chairoungdua, A., D.L. Smith, P. Pochard, M. Hull, and M.J. Caplan. 2010. Exosome release of beta-catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology.* 190:1079-1091.
- Chavrier, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, and M. Zerial. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell.* 62:317-329.
- Chivero, E.T., N. Bhattarai, R.T. Rydze, M.A. Winters, M. Holodniy, and J.T. Stapleton. 2014. Human pegivirus RNA is found in multiple blood mononuclear cells in vivo and serum-derived viral RNA-containing particles are infectious in vitro. *Journal of General Virology.* 95:1307-1319.
- Christianson, H.C., K.J. Svensson, T.H. van Kuppevelt, J.-P. Li, and M. Belting. 2013. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 110:17380-17385.
- De Carvalho, J.V., R.O. De Castro, E.Z.M. Da Silva, P.P. Silveira, M.E. Da Silva-Januário, E. Arruda, M.C. Jamur, C. Oliver, R.S. Aguiar, and L.L.P. DaSilva. 2014. Nef neutralizes the ability of exosomes from CD4+ T cells to act as decoys during HIV-1 infection. *PLoS ONE.* 9.
- Delabranche, X., a. Berger, J. Boisramé-Helms, and F. Meziani. 2012. Microparticles and infectious diseases. *Medecine et Maladies Infectieuses.* 42:335-343.
- Dengvaxia®. 2015. Dengvaxia® First Dengue Vaccine Approved in Brazil.50-53.
- Dukers, D.F., P. Meij, M.B. Vervoort, W. Vos, R.J. Scheper, C.J. Meijer, E. Bloemena, and J.M. Middeldorp. 2000. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950).* 165:663-670.
- Ekström, K., O. Omar, C. Granéli, X. Wang, F. Vazirisani, and P. Thomsen. 2013. Monocyte Exosomes Stimulate the Osteogenic Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE.* 8:e75227.
- Erdbrügger, U., and J. Lannigan. 2015. Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytometry Part A.*

- Eric, M.T., P.A. Ana Concepción, and P.S. Ernesto Benjamín. 2008. ¿Por qué y cómo mueren los niños con dengue? *Rev Cubana Med Trop.* 60:0.
- Esser, M.T., D.R. Graham, L.V. Coren, M. Charles, J.W.B. Jr, L.O. Arthur, D.E. Ott, and J.D. Lifson. 2001. Differential Incorporation of CD45 , CD80 Histocompatibility Complex Class I and II Molecules into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions and Microvesicles : Implications for Viral Pathogenesis and Immune Regulation Differential Incorporation of CD45. *Journal of Virology.* 80:6173-6182.
- Fang, Y., N. Wu, X. Gan, W. Yan, J.C. Morrell, and S.J. Gould. 2007. Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV Gag to exosomes. *PLoS Biology.* 5:1267-1283.
- Feng, Z., L. Hensley, K.L. McKnight, F. Hu, V. Madden, L. Ping, S. Jeong, C. Walker, R. Lanford, and S.M. Lemon. 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature.* 496:367-371.
- Flanagan, J., J. Middeldorp, and T. Sculley. 2003. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *Journal of General Virology.* 84:1871-1879.
- Ford, T., J. Graham, and D. Rickwood. 1994. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Analytical biochemistry.* 220:360-366.
- Fraile-Ramos, A., V. Cepeda, E. Elstak, and P. van der Sluijs. 2010. Rab27a is required for human cytomegalovirus assembly. *PLoS ONE.* 5.
- Futter, C.E., and I.J. White. 2007. Annexins and endocytosis. *In Traffic.* Vol. 8. 951-958.
- Gangoda, L., S. Boukouris, M. Liem, H. Kalra, and S. Mathivanan. 2014. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic? *Proteomics:*1-37.
- Gauvreau, M.I., M.H.I.n. C??t??, M.C. Bourgeois-Daigneault, L.D. Rivard, F. Xiu, A. Brunet, A. Shaw, V. Steimle, and J. Thibodeau. 2009. Sorting of MHC class II molecules into exosomes through a ubiquitin-independent pathway. *Traffic.* 10.
- Gerber, P.P., M. Cabrini, C. Jancic, L. Paoletti, C. Banchio, C.v. Bilderling, L. Sigaut, L.I. Pietrasanta, G. Duette, E.O. Freed, G.d.S. Basile, C.F. Moita, L.F. Moita, S. Amigorena, P. Benaroch, J. Geffner, and M. Ostrowski. 2015. Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Journal of Cell Biology.* 209:435-452.
- Gonzales, P.A., T. Pisitkun, J.D. Hoffert, D. Tchapyjnikov, R.a. Star, R. Kleta, N.S. Wang, and M.a. Knepper. 2009. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 20:363-379.
- Gould, S.J., A.M. Booth, and J.E.K. Hildreth. 2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100:10592-10597.
- Gutiérrez-López, M.D., A. Gilsanz, M. Yáñez-Mo, S. Ovalle, E.M. Lafuente, C. Domínguez, P.N. Monk, I. González-Alvaro, F. Sánchez-Madrid, and C. Cabañas. 2011. The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 68:3275-3292.

- Gutzeit, C., N. Nagy, M. Gentile, K. Lyberg, J. Gumz, H. Vallhov, I. Puga, E. Klein, S. Gabrielsson, A. Cerutti, and A. Scheynius. 2014. Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 192:5852-5862.
- Guzman, M.G., and E. Harris. 2015. Dengue. *The Lancet*. 385:453-465.
- Guzman, M.G., and G. Kouri. 2008. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *In Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 102. 522-523.
- György, B., T.G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, É. Pállinger, E. Pap, Á. Kittel, G. Nagy, A. Falus, and E.I. Buzás. 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 68:2667-2688.
- Halstead, S.B. 2003. Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses. *Advances in Virus Research*. 60:421-467.
- Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *In Journal of Cell Biology*. Vol. 97. 329-339.
- Hemler, M.E. 2008. Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nature reviews. Drug discovery*. 7:747-758.
- Higa, L.M., M.B. Caruso, F. Canellas, M.R. Soares, A.L. Oliveira-Carvalho, D.a. Chapeaurouge, P.M. Almeida, J. Perales, R.B. Zingali, and A.T. Da Poian. 2008. Secretome of HepG2 cells infected with dengue virus: implications for pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 1784:1607-1616.
- Honegger, A., D. Schilling, S. Bastian, J. Sponagel, V. Kuryshev, H. S??ltmann, M. Scheffner, K. Hoppe-Seyler, and F. Hoppe-Seyler. 2015. Dependence of Intracellular and Exosomal microRNAs on Viral E6/E7 Oncogene Expression in HPV-positive Tumor Cells. *PLoS Pathogens*. 11:1-33.
- Hong, P., M.R. Ninonuevo, B. Lee, C. Lebrilla, and L. Bode. 2009. Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *Br J Nutr*. 101:482-486.
- Hsu, C., Y. Morohashi, S.I. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M.A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Gronborg, W. Möbius, J. Rhee, F.A. Barr, and M. Simons. 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *Journal of Cell Biology*. 189:223-232.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. Endosome maturation. *The EMBO journal*. 30:3481-3500.
- Hurley, J.H., and P.I. Hanson. 2010. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:556-566.
- Iraci, N., T. Leonardi, F. Gessler, B. Vega, and S. Pluchino. 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*. 17:171.
- Jaworski, E., A. Narayanan, R. Van Duyne, S. Shabbeer-Meyering, S. Iordanskiy, M. Saifuddin, R. Das, P.V. Afonso, G.C. Sampey, M. Chung, A. Popratiloff, B. Shrestha, M. Sehgal, P. Jain, A. Vertes, R. Mahieux, and F. Kashanchi. 2014.

- Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain tax protein. *Journal of Biological Chemistry*. 289:22284-22305.
- Jeppesen, D.K., A. Nawrocki, S.G. Jensen, K. Thorsen, B. Whitehead, K.A. Howard, L. Dyrskjøt, T.F. Ørntoft, M.R. Larsen, and M.S. Ostenfeld. 2014. Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics*. 14:699-712.
- Johnstone, R.M., M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 262:9412-9420.
- Kalamvoki, M., T. Du, and B. Roizman. 2014. Cells infected with herpes simplex virus 1 export to uninfected cells exosomes containing STING, viral mRNAs, and microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:E4991-4996.
- Kalayanaraj, S., D.W. Vaughn, S. Nimmannitya, S. Green, S. Suntayakorn, N. Kunentrasai, W. Viramitrachai, S. Ratanachu-eke, S. Kiatpolpoj, B.L. Innis, a.L. Rothman, a. Nisalak, and F.a. Ennis. 1997. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of infectious diseases*. 176:313-321.
- Keryer-Bibens, C., C. Pioche-Durieu, C. Villemant, S. Souquère, N. Nishi, M. Hirashima, J. Middeldorp, and P. Busson. 2006. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC cancer*. 6:283.
- Khan, S., J.M.S. Jutzy, J.R. Aspe, D.W. McGregor, J.W. Neidigh, and N.R. Wall. 2011. Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis*. 16:1-12.
- Khatua, A.K., H.E. Taylor, J.E.K. Hildreth, and W. Popik. 2009. Exosomes Packaging APOBEC3G Confer Human Immunodeficiency Virus Resistance to Recipient Cells. *Journal of Virology*. 83:512-521.
- Konadu, K.A., M.B. Huang, W. Roth, W. Armstrong, M. Powell, F. Villinger, and V. Bond. 2016. Isolation of Exosomes from the Plasma of HIV-1 Positive Individuals. *Journal of visualized experiments : JoVE*:1-9.
- Kornek, M., Y. Popov, T.A. Libermann, N.H. Afdhal, and D. Schuppan. 2011. Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology*. 53:230-242.
- Krishnamoorthy, L., J.W.B. Jr, A.B. Preston, K. Nagashima, and L.K. Mahal. 2009. HIV-1 and microvesicles from T-cells share a common glycome, arguing for a common origin. *Nat Chem Biol*. 5:244-250.
- Krishnan, M.N., B. Sukumaran, U. Pal, H. Agaisse, J.L. Murray, T.W. Hodge, and E. Fikrig. 2007. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *Journal of virology*. 81:4881-4885.
- Kuhn, R.J.e.a. 2002. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation and Fusion. *Current Opinion in Microbiology*. 14:470-475.
- Lane, B.R., D.M. Markovitz, N.L. Woodford, R. Rochford, R.M. Strieter, and M.J. Coffey. 1999. TNF-alpha inhibits HIV-1 replication in peripheral blood

- monocytes and alveolar macrophages by inducing the production of RANTES and decreasing C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 163:3653-3661.
- Latysheva, N., G. Muratov, S. Rajesh, M. Padgett, N.A. Hotchin, M. Overduin, and F. Berditchevski. 2006. Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Molecular and cellular biology*. 26:7707-7718.
- Le Blanc, I., P.-P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demaux, J. Fauré, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nature cell biology*. 7:653-664.
- Lenassi, M., G. Cagney, M. Liao, T. Vaupotič, K. Bartholomeeusen, Y. Cheng, N.J. Krogan, A. Plemenitaš, and B.M. Peterlin. 2010. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic*. 11:110-122.
- Li, J., K. Liu, Y. Liu, Y. Xu, F. Zhang, H. Yang, J. Liu, T. Pan, J. Chen, M. Wu, X. Zhou, and Z. Yuan. 2013. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- α -induced antiviral activity. *Nature immunology*. 14:793-803.
- Liu, W.T., C.L. Chen, S.S.J. Lee, C.C. Chan, F.L. Lo, and Y.C. Ko. 1991. Isolation of dengue virus with a human promonocyte cell line. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 44:494-499.
- Liu, Z., X. Zhang, Q. Yu, and J.J. He. 2014. Exosome-associated hepatitis C virus in cell cultures and patient plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 455:218-222.
- Longatti, A. 2015. The dual role of exosomes in hepatitis A and C virus transmission and viral immune activation. *Viruses*. 7:6707-6715.
- Longatti, A., B. Boyd, and F.V. Chisari. 2015. Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells. *Journal of virology*. 89:2956-2961.
- Ludwig, A.K., and B. Giebel. 2012. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 44:11-15.
- Luga, V., L. Zhang, A.M. Vitoria-Petit, A.A. Ogunjimi, M.R. Inanlou, E. Chiu, M. Buchanan, A.N. Hosein, M. Basik, and J.L. Wrana. 2012. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*. 151:1542-1556.
- Mack, M., a. Kleinschmidt, H. Brühl, C. Klier, P.J. Nelson, J. Cihak, J. Plachý, M. Stangassinger, V. Erfle, and D. Schlöndorff. 2000. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature medicine*. 6:769-775.
- Martins, S.D.T., G.F. Silveira, L.R. Alves, C.N.D. dos Santos, and J. Bordignon. 2012. Dendritic cell apoptosis and the pathogenesis of dengue. *Viruses*. 4:2736-2753.
- Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson. 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*. 73:1907-1920.

- Mazurov, D., L. Barbashova, and A. Filatov. 2013. Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes. *FEBS Journal*. 280:1200-1213.
- Melo, S.A., H. Sugimoto, J.T. O'Connell, N. Kato, A. Villanueva, A. Vidal, L. Qiu, E. Vitkin, L.T. Perelman, C.A. Melo, A. Lucci, C. Ivan, G.A. Calin, and R. Kalluri. 2014. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 26:707-721.
- Mukhopadhyay, S., R.J. Kuhn, and M.G. Rossmann. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews. Microbiology*. 3:13-22.
- Mustafa, M.S., V. Rasotgi, S. Jain, and V. Gupta. 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*. 71:67-70.
- Nantakomol, D., A.M. Dondorp, S. Krudsood, R. Udomsangpetch, K. Pattanapanyasat, V. Combes, G.E. Grau, N.J. White, P. Viriyavejakul, N.P.J. Day, and K. Chotivanich. 2011. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *Journal of Infectious Diseases*. 203:700-706.
- Narayanan, A., S. Iordanskiy, R. Das, R. Van Duyne, S. Santos, E. Jaworski, I. Guendel, G. Sampey, E. Dalby, M. Iglesias-Ussel, A. Popratiloff, R. Hakami, K. Kehn-Hall, M. Young, C. Subra, C. Gilbert, C. Bailey, F. Romerio, and F. Kashanchi. 2013. Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. *Journal of Biological Chemistry*. 288:20014-20033.
- Nieuwland, R., R.J.R. Berckmans, S. McGregor, A.N. Böing, F.P.H. Th. M. Romijn, R.G.J. Westendorp, C.E. Hack, and A. Sturk. 2000. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 95:930-935.
- Nimmannitya, S., S.B. Halstead, S.N. Cohen, and M.R. Margiotta. 1969. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18:954-971.
- Noisakran, S., N. Onlamoon, P. Songprakhon, H.M. Hsiao, K. Chokeyphaibulkit, and G.C. Perng. 2010. Cells in dengue virus infection in vivo. *Advances in Virology*. 2010.
- Nour, A.M., Y. Li, J. Wolenski, and Y. Modis. 2013. Viral Membrane Fusion and Nucleocapsid Delivery into the Cytoplasm are Distinct Events in Some Flaviviruses. *PLoS Pathogens*. 9.
- Nour, A.M., and Y. Modis. 2014. Endosomal vesicles as vehicles for viral genomes. *Trends in Cell Biology*. 24:449-454.
- Okeoma, C.M., A.L. Huegel, J. Lingappa, M.D. Feldman, and S.R. Ross. 2010. APOBEC3 proteins expressed in mammary epithelial cells are packaged into retroviruses and can restrict transmission of milk-borne virions. *Cell Host and Microbe*. 8:534-543.
- Østergaard, O., C.T. Nielsen, L.V. Iversen, S. Jacobsen, J.T. Tanassi, and N.H.H. Heegaard. 2012. Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. *Journal of Proteome Research*. 11:2154-2163.
- Ostrowski, M., N.B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C.F. Moita, K. Schauer, A.N. Hume, R.P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N.

- Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M.C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L.F. Moita, and C. Thery. 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*. 12:19-30; sup pp 11-13.
- Ott, D.E. 2008. Cellular proteins detected in HIV-1. *In Reviews in Medical Virology*. Vol. 18. 159-175.
- PAHO. 2016. Lab. Confirm. Rate. 2015:1-2.
- Pang, T., M.J. Cardoso, and M.G. Guzman. 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 85:43-45.
- Pawliczek, T., and C.M. Crump. 2009. Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression. *Journal of virology*. 83:11254-11264.
- Pegtel, D.M., K. Cosmopoulos, D.A. Thorley-Lawson, M.A.J. van Eijndhoven, E.S. Hopmans, J.L. Lindenberg, T.D. de Gruijl, T. Würdinger, and J.M. Middeldorp. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:6328-6333.
- Perez-Hernandez, D., C. Gutiérrez-Vázquez, I. Jorge, S. López-Martín, A. Ursa, F. Sánchez-Madrid, J. Vázquez, and M. Yañez-Mó. 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *Journal of Biological Chemistry*. 288:11649-11661.
- Pfeffer S, Z.M., Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. 2004. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science*. 304:734-736.
- Phuong, C.X.T., T.N. Ngo, B.A. Wills, R. Kneen, N.T.T. Ha, T.T.T. Mai, T.T.T. Huynh, D.T.K. Lien, T. Solomon, J.A. Simpson, N.J. White, J.J. Farrar, P.T.T. Thuy, N.T.T. Anh, T.T. Tran, D.L. Truong, V.M. Nguyen, N.T.Q. Phuong, V.T. Chu, and N.T.T. Nga. 2002. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Viet Nam. *Tropical Medicine and International Health*. 7:125-132.
- Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager. 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of virology*. 76:4008-4021.
- Punyadee, N., D. Mairiang, S. Thiemmecca, C. Komoltri, W. Pan-ngum, N. Chomanee, K. Charngkaew, N. Tangthawornchaikul, W. Limpitikul, S. Vasanawathana, P. Malasit, and P. Avirutnan. 2015. Microparticles Provide a Novel Biomarker To Predict Severe Clinical Outcomes of Dengue Virus Infection. *Journal of Virology*. 89:1587-1607.
- Qu, Y., L. Franchi, G. Nunez, and G.R. Dubyak. 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol*. 179:1913-1925.
- Raiborg, C., and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 458:445-452.

- Ramakrishnaiah, V., C. Thumann, I. Fofana, F. Habersetzer, Q. Pan, P.E. de Ruiter, R. Willemsen, J.A.A. Demmers, V. Stalin Raj, G. Jenster, J. Kwekkeboom, H.W. Tilanus, B.L. Haagmans, T.F. Baumert, and L.J.W. van der Laan. 2013. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:13109-13113.
- Raposo, G., H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C.V. Harding, C.J. Melief, and H.J. Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*. 183:1161-1172.
- Raposo, G., and W. Stoorvogel. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 200:373-383.
- Requena, M., H. Bouhlal, N. Nasreddine, H. Saidi, J.C. Gody, S. Aubry, G. Grésenguet, M.D. Kazatchkine, R.P. Sekaly, L. Bélec, and H. Hocini. 2008. Inhibition of HIV-1 transmission in trans from dendritic cells to CD4 + T lymphocytes by natural antibodies to the CRD domain of DC-SIGN purified from breast milk and intravenous immunoglobulins. *Immunology*. 123:508-518.
- Rigau-Pérez, J.G. 1998. The early use of break-bone fever (quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59:272-274.
- Robbins, P.D., and A.E. Morelli. 2014. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature reviews. Immunology*. 14:195-208.
- Rothman, A., and F. Ennis. 1999. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 6:1-6.
- Rothman, J.E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*. 372:55-63.
- Rowe, R.K., J.W. Suszko, and A. Pekosz. 2008. Roles for the recycling endosome, Rab8, and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells. *Virology*. 382:239-249.
- Rozmyslowicz, T., M. Majka, J. Kijowski, S.L. Murphy, D.O. Conover, M. Poncz, J. Ratajczak, G.N. Gaulton, and M.Z. Ratajczak. 2003. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS (London, England)*. 17:33-42.
- Saeland, E., M.A.W.P. de Jong, A.A. Nabatov, H. Kalay, T.B.H. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2009. MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Molecular Immunology*. 46:2309-2316.
- Sampey, G.C., S.S. Meyering, M. Asad Zadeh, M. Saifuddin, R.M. Hakami, and F. Kashanchi. 2014a. Exosomes and their role in CNS viral infections. *In Journal of NeuroVirology*. Vol. 20. Springer New York LLC. 199-208.
- Savina, A., C.M. Fader, M.T. Damiani, and M.I. Colombo. 2005. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*. 6:131-143.
- Savina, A., M. Vidal, and M.I. Colombo. 2002. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *Journal of cell science*. 115:2505-2515.

- Schorey, J.S., Y. Cheng, P.P. Singh, and V.L. Smith. 2015. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports*. 16:24-43.
- Silverman, J.M., and N.E. Reiner. 2011. Exosomes and other microvesicles in infection biology: Organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology*. 13:1-9.
- SINAVE/DGE. 2016. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica. Panorama epidemiológico de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. 14.
- Srikiatkachorn, A., A. Krautrachue, W. Ratanaprakarn, L. Wongtapradit, N. Nithipanya, and S. Kalayanarooj. 2007. Natural History of Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever: A Serial Ultrasonographic Study. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 174:1882-1886.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:513-525.
- Teow, S.-y., A.C. Nordin, and A.S.-b. Khoo. 2016. Exosomes in Human Immunodeficiency Virus Type I Pathogenesis : Threat or Opportunity ? 2016.
- Théry, C., S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. In *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*. Vol. Chapter 3. Unit 3.22.
- Théry, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena. 2001. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology*. 166:7309-7318.
- Théry, C., M. Ostrowski, and E. Segura. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology*. 9:581-593.
- Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews. Immunology*. 2:569-579.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brügger, and M. Simons. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*. 319:1244-1247.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 26:171-176.
- Turturici, G., R. Tinnirello, G. Sconzo, and F. Geraci. 2014. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. In *American journal of physiology. Cell physiology*. Vol. 306. C621-633.
- Utlej, T.J., N.A. Ducharme, V. Varthakavi, B.E. Shepherd, P.J. Santangelo, M.E. Lindquist, J.R. Goldenring, and J.E. Crowe. 2008. Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:10209-10214.
- Valadi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, and J.O. Lötvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. In *Nature cell biology*. Vol. 9. 654-659.

- van der Pol, E., A.N. Böing, P. Harrison, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2012a. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*. 64:676-705.
- Van Der Pol, E., M.J.C. Van Gemert, a. Sturk, R. Nieuwland, and T.G. Van Leeuwen. 2012b. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 10:919-930.
- Van Der Schaar, H.M., M.J. Rust, Chen, H. Van Der Ende-Metselaar, J. Wilschut, X. Zhuang, and J.M. Smit. 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens*. 4.
- van Niel, G., S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M.S. Marks, E. Rubinstein, and G. Raposo. 2011. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell*. 21:708-721.
- Verweij, F.J., M.a.J. van Eijndhoven, E.S. Hopmans, T. Vendrig, T. Wurdinger, E. Cahir-McFarland, E. Kieff, D. Geerts, R. van der Kant, J. Neefjes, J.M. Middeldorp, and D.M. Pegtel. 2011. LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation. *The EMBO journal*. 30:2115-2129.
- Villarroya-Beltri, C., F. Baixauli, C. Gutiérrez-Vázquez, F. Sánchez-Madrid, and M. Mittelbrunn. 2014. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*. 28:3-13.
- Vlassov, A.V., S. Magdaleno, R. Setterquist, and R. Conrad. 2012. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1820:940-948.
- Votteler, J., and W.I. Sundquist. 2013. Virus budding and the ESCRT pathway. *In Cell Host and Microbe*. Vol. 14. 232-241.
- Wang, X., Z. Ao, L. Chen, G. Kobinger, J. Peng, and X. Yao. 2012. The cellular antiviral protein APOBEC3G interacts with HIV-1 reverse transcriptase and inhibits its function during viral replication. *Journal of virology*. 86:3777-3786.
- Wang, X., H.-K. Wang, Y. Li, M. Hafner, N.S. Banerjee, S. Tang, D. Briskin, C. Meyers, L.T. Chow, X. Xie, T. Tuschl, and Z.-M. Zheng. 2014. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:4262-4267.
- Whitehead, S.S., J.E. Blaney, A.P. Durbin, and B.R. Murphy. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature reviews. Microbiology*. 5:518-528.
- Whitehorn, J., and C.P. Simmons. 2011. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 29:7221-7228.
- WHO. 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*:147.
- WHO. 2012. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*:35.
- Wiley, R.D., and S. Gummuluru. 2006. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:738-743.

- Witwer, K.W., E.I. Buzás, L.T. Bemis, A. Bora, C. Lässer, J. Lötvall, E.N. Nolte-'t Hoen, M.G. Piper, S. Sivaraman, J. Skog, C. Théry, M.H. Wauben, and F. Hochberg. 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of extracellular vesicles*. 2:1-25.
- Wubbolts, R., R.S. Leckie, P.T.M. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Møbius, J. Hoernschemeyer, J.W. Slot, H.J. Geuze, and W. Stoorvogel. 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: Potential implications for their function and multivesicular body formation. *Journal of Biological Chemistry*. 278:10963-10972.
- Yáñez-Mó, M., P.R.-M. Siljander, Z. Andreu, A.B. Zavec, F.E. Borràs, E.I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colás, A.C.-d. Silva, S. Fais, J.M. Falcon-Perez, I.M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N.H.H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E.-M. Krämer-Albers, S. Laitinen, C. Lässer, T. Lener, E. Ligeti, A. Linē, G. Lipps, A. Llorente, J. Lötvall, M. Manček-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E.N.M.N.-t. Hoen, T.a. Nyman, L. O'Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, É. Pállinger, H.a.D. Portillo, J. Reventós, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sánchez-Madrid, N. Santarém, K. Schallmoser, M.S. Ostendorf, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S.G.V.D. Grein, M.H. Vasconcelos, M.H.M. Wauben, and O.D. Wever. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*. 4:1-60.
- Yoon, Y.J., O.Y. Kim, and Y.S. Gho. 2014. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *In* BMB Reports. Vol. 47. 531-539.
- Zaitseva, E., S.T. Yang, K. Melikov, S. Pourmal, and L.V. Chernomordik. 2010. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathogens*. 6.
- Zhu, X., Z. He, J. Yuan, W. Wen, X. Huang, Y. Hu, C. Lin, J. Pan, R. Li, H. Deng, S. Liao, R. Zhou, J. Wu, J. Li, and M. Li. 2015. IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cellular Microbiology*. 17:105-118.
- Zitvogel, L., a. Regnault, a. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*. 4:594-600.