



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Participación de los exosomas de monocitos en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la infección por el virus Zika

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**BIOL. EXP. JESSICA JANETH AVILEZ AVILEZ**

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

**DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UAM

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, la doctora Blanca H. Ruiz Ordaz por permitirme llevar a cabo mi proyecto de maestría en su laboratorio, sus comentarios y asesoría académica durante el desarrollo del presente proyecto y en la tesis.

A la doctora Beatriz Gómez González, quien formó parte de mi comité tutor y por el enriquecimiento académico y asesoría en el ámbito del estudio con la BHE.

A la doctora Marcela Lizano Soberón por formar parte de mi comité tutor, por su amabilidad y enriquecimiento con sus comentarios y preguntas sobre la parte de Virología.

A la doctora Verónica Monroy Martínez, técnico académico en el laboratorio de la Dra. Blanca Ruiz, por todo el apoyo en las técnicas experimentales utilizados, así como sus buenos consejos y compañía

Al laboratorio de Psiconeurobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa) por mantener las puertas abiertas para trabajar además del apoyo con los anticuerpos y trazadores utilizados en el modelo de permeabilidad de barrera hematoencefálica, indispensables para llevar a cabo la parte del modelo *in vivo* de mi tesis.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT), en especial al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba, por la capacitación para la adquisición y análisis de muestras en citometría de flujo.

A la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, al Dr. Víctor Daniel Garzón por todas las atenciones brindadas en el presente

proyecto, así como a la MVZ Rubí Elizabeth Zavala Gaytán, por su apoyo con el modelo animal, por el apoyo en cuestiones técnicas, y sobre todo por ser tan amable siempre.

Al laboratorio de la dra. María Eugenia Gonsebatt por permitirme utilizar el equipo de detección de fluorescencia para la cuantificación de los trazadores.

A mi compañero en el laboratorio, el M. en C. Pedro Pablo Martínez Rojas por su asesoría en cultivo celular, en el manejo de la línea de monocitos humanos THP-1, así como en la extracción de vesículas extracelulares.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al Programa de Apoyo para los Estudiantes de Posgrado (PAEP), por el apoyo económico otorgado para participar en el IV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Neuroinmunoendocrinología, (Puerto Vallarta, 2019).

A la DGAPA por el apoyo económico mediante el Proyecto PAPIIT No.IN216520

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

***Dedico este trabajo a mis padres, mis hermanos y mis sobrinas, quienes han sido mi inspiración. Gracias por su apoyo, amor y paciencia.***

Quiero agradecer a:

A mis compañeros Elizabeth, Toño y Ofelia por sus consejos y compañía; a Itzel y Citlali por su amistad.

A Gaby, amiga y guía en mi formación, quien me ha enseñado con su ejemplo, que el conocimiento se comparte.

A Fernanda, quien me ha brindado su amistad, y una de las personas con quien puedo compartir el amor por la ciencia.

A Alejandro, una persona muy especial, quien me ha dado su cariño y apoyo incondicional en momentos realmente difíciles y me ha inspirado a ser mejor. Te estaré eternamente agradecida.

## TABLA DE CONTENIDO

1. Summary.....	7
2. Abreviaturas.....	8
3. Introducción.....	10
A. Zika .....	10
A.I Origen, distribución y epidemiología.....	10
A.II Transmisión.....	12
A.III Cuadro clínico.....	12
B. Virus Zika.....	13
B.I Ciclo de replicación.....	15
B.II Célula blanco: el monocito.....	16
C. Vesículas Extracelulares.....	18
C.I Biogénesis de los exosomas.....	19
C.II Vesículas extracelulares en condiciones patológicas.....	20
C.III El papel de las EVs en infecciones virales.....	21
D. <i>Flavivirus</i> neurotrópicos.....	23
E.I Estructura y función de la barrera hematoencefálica.....	24
E.I Alteraciones de la barrera hematoencefálica.....	25
4. Planteamiento Del Problema.....	27
5. Hipótesis.....	28
6. Objetivo General.....	28

7. Objetivos Específicos.....	29
8. Diseño Experimental.....	30
9. Metodología.....	31
10. Resultados.....	40
11. Discusión.....	56
12. Conclusión.....	65
13. Referencias.....	66



## 1. SUMMARY

The blood brain barrier (BBB) is a cellular complex located at brain microvasculature, that regulates the exchange of different molecules between the cerebral parenchyma and the bloodstream. The BBB can be disrupted during the infection with neurotropic viruses such as Zika virus (ZIKV), producing encephalitis, microcephaly and autoimmunity (Guillain-Barré syndrome). The main ZIKV target cell is the monocyte, that once activated, release extracellular vesicles (EVs). We evaluated the effect of small EVs released by ZIKV-infected monocytes in the BBB permeability and compared with the changes induced directly by the virus in an *in vivo* murine model. Male BALB/c mice were intra-peritoneally injected with exosomes of ZIKV infected human monocytes (exZIKV). For the BBB permeability assays we used Evans blue and sodium fluorescein as tracers. The cerebellum, cortex and subcortical regions were excised, and tissue tracer concentration was evaluated after variable periods of exZIKV administration. We found that exZIKV increased BBB permeability to Evans blue and sodium in the subcortical area, with a loss of claudin-5 tight junction protein. BBB permeability probably are related to the proinflammatory processes induced by the ZIKV and exZIKV.

## 2. ABREVIATURAS

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**AXL:** Receptor tirosina cinasa

**BALB/c:** cepa de ratón albino

**BHE:** barrera hematoencefálica

**d:** días

**Da:** Daltons

**CD9:** Cluster de Diferenciación 9

**CD11b:** Cluster de diferenciación 11 b

**CD63:** Cluster de diferenciación 63

**CD81:** Cluster de diferenciación 81

**Cldn-5:** Claudina-5

**C6/36:** Línea celular de homogenado de larva de mosquito *Aedes albopictus*

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DENV:** virus dengue

**ESCRT:** Complejo Endosomal Requerido para el Transporte

**exMOCK:** Exosomas derivados de monocitos no infectados

**ExZIKV:** Exosomas derivados de monocitos infectados con el virus zika

**GAPDH:** Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa

**GFAP:** Proteína Glial Fibrilar ácida

**hPI:** horas post-infección

**Iba-1:** molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1

**ICAM:** Molécula de adhesión intercelular

**ILV:** Vesícula Intraluminal

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1  $\beta$

**IL-6:** interleucina 6

**IL-8:** interleucina 8

**IMF:** Intensidad Media de Fluorescencia

**JEV:** virus de la encefalitis japonesa

**LPS:** Lipopolisacárido

**MP:** Micropartículas

**MVB:** Cuerpo Multivesiculado

**Na-F:** Sodio acoplado a fluoresceína

**NF-Kb:** Factor Nuclear kappa B

**N154:** Asparagina 154

**OMS:** Organización Mundial de la salud

**PA:** Post-administración

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**Rab:** familia de proteínas GTPasas de la superfamilia Ras

**SNARE:** Soluble NSF Attachment Protein (SNAP) Receptor

**SGB:** Síndrome de Guillain-Barré

**SNC:** Sistema nervioso central

**SCZ:** síndrome congénito por el virus zika

**TBEV:** Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas

**TEER:** Resistencia Eléctrica Trans Endotelial

**THP-1:** línea celular de monocitos humanos

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**VCAM:** Molécula celular de adhesión vascular

**EVs:** Vesículas extracelulares

**WNV:** Virus del Nilo occidental

**YFV:** Virus de la fiebre amarilla

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humano

**ZIKV:** Virus Zika

**ZO-1:** Proteína zónula Ocludens 1

# **Participación de los exosomas de monocitos en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la infección por el virus Zika**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **A. El Zika**

El Zika es una arbovirosis cuyo agente causal es el virus Zika (ZIKV), el cual se distribuye geográficamente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, correspondiendo a las áreas de distribución del vector, principalmente mosquitos hembra del género *Aedes* (Song y cols., 2017). El Zika ha tomado relevancia en los últimos años debido a las alteraciones que causan en el sistema nervioso (Acosta-Ampudia y cols., 2018), autoinmunidad, anomalías congénitas, así como a sus diversas formas en que el virus es transmitido, ya que además de la transmisión vectorial, también se describió la transmisión sexual, y la transmisión vertical (Gregory y cols., 2017).

#### **A.I Origen, distribución y epidemiología del ZIKV**

El ZIKV se aisló por primera vez en los bosques de Zika en Uganda en 1947 del mono *Macacus Rhesus* 766, constituyendo el primer aislado viral (MR766). En 1954 se reportaron casos de infección en humanos que presentaban un cuadro clínico autolimitante. El virus se contuvo en África y Asia durante alrededor de 70 años (Kindhauser y cols., 2016), hasta que en 2007, se registraron nuevos brotes en las islas Yap, donde se estima que aproximadamente el 73% de la población estuvo infectada y

el 18% manifestó un cuadro clínico y (Musso y cols., 2016), en 2013 en la Polinesia Francesa alrededor del 11% (28000 casos) de la población fue tratada por posible infección de ZIKV (Song y cols., 2017; Cao-Lorneau y cols., 2014) en donde además del cuadro clínico autolimitante se reportó una forma severa, la cual afectaba al sistema nervioso, describiendo casos de autoinmunidad, específicamente Síndrome de Guillain-Barré (SGB) y afectaciones neurológicas (Acosta-Ampudia y cols., 2018). En 2015 el virus fue detectado en el continente americano en Brasil, en donde se reportó un aumento en el número de neonatos que presentaban microcefalia y algunas otras afectaciones congénitas, a lo que se le nombró Síndrome congénito por virus zika (SCZ) (Musso y cols., 2016; Hills y cols., 2017), por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una alerta epidemiológica ese año (Organización Mundial de la Salud, 2015). Hasta febrero del 2018 se habían reportado 3700 casos de defectos congénitos asociados a ZIKV en Brasil (Musso y cols., 2019). El virus se dispersó rápidamente a lo largo del continente americano, reportándose casos autóctonos de transmisión de ZIKV en alrededor de 48 ciudades del continente en un periodo de un año, incluyendo varias ciudades de México (Song y cols., 2017).

Hasta agosto del 2020 se han reportado en México 12940 casos confirmados de Zika, siendo Veracruz el estado con más casos (2105) reportados. Del total de los casos confirmados, aproximadamente el 55.14% corresponde a embarazadas, de los cuales 926 fueron reportados en el estado de Yucatán. Por otro lado, la forma grave de la enfermedad se hizo presente en México, con 55 casos de SCZ y 19 de SGB, de los cuales el 68.4% se presentaron en hombres (Dirección General de Epidemiología, S31,2020).

## **A.II Transmisión**

El ZIKV se transmite principalmente por la picadura del mosquito hembra del género *Aedes* (Boyer y cols., 2018; Liu Z y cols., 2017), sin embargo, a diferencia de otros *Flavivirus* de importancia clínica como el virus Dengue (DENV), además de la transmisión vectorial, destaca la transmisión vertical, es decir, que puede transmitirse de la madre al hijo durante la gestación. El riesgo de que el producto presente síndrome congénito aumenta cuando la madre es infectada dentro de los 3 primeros meses de gestación. También se ha descrito transmisión de ZIKV por transfusión sanguínea (Barjas-Castro y cols., 2016) y por vía sexual (Russel y cols., 2017). Además, se ha descrito que el virus puede encontrarse en diferentes fluidos corporales como lágrimas, saliva y semen y que puede permanecer circulante en el cuerpo hasta por un periodo de 6 meses sin ocasionar signos o síntomas (Acosta-Ampudia y cols., 2018).

## **A.III Cuadro clínico**

El ZIKA tiene un periodo prodrómico corto que va de 2 a 7 días, las personas infectadas pueden presentar un cuadro clínico que generalmente es benigno pero autolimitante en el que se presentan signos y/o síntomas inespecíficos como fiebre, artralgia, cefalea y mialgia, los cuales se manifiestan en aproximadamente el 90% de las personas infectadas (Organización Mundial de la Salud, 2015). La mayoría de las personas infectadas logran recuperarse, sin embargo, aproximadamente el 10% desarrolla la forma grave del Zika. Las formas graves de la enfermedad involucran diferentes afectaciones neurológicas que dependen de la edad (en el caso de neonatos SCZ y en adultos SGB).

El SCZ se caracteriza por mal formaciones congénitas siendo la afectación más común la microcefalia, en la cual hay una reducción de la circunferencia de la cabeza del infante. Se han descrito algunos mecanismos que podrían estar involucrados en el desarrollo del síndrome congénito por ZIKV, por un lado, se propone la muerte celular (apoptosis) de las neuronas en desarrollo y por otro lado también se ha descrito la interrupción de la diferenciación celular, es decir, que las células del SNC no terminan de desarrollarse y/o diferenciarse (Liu y cols., 2018; Devhare y cols., 2017).

En el caso de adultos, se ha reportado el desarrollo de autoinmunidad, específicamente se describen casos de SGB los cuales se caracterizan por la desmielinización de las neuronas periféricas, lo cual resulta en parálisis corporal (Muñoz y cols., 2017). Debido a la elevada prevalencia de Zika y a la existencia de formas graves del padecimiento, se ha considerado al Zika como un problema importante de salud pública (OMS, 2015).

## **B. Virus Zika: estructura**

El ZIKV pertenece a la familia *Flaviviridae* y se agrupa dentro del género *Flavivirus*, en el cual se encuentran otros arbovirus de importancia médica como son el virus dengue (DENV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) entre otros. Dentro de las principales características que comparte este género es que gran parte de ellos son virus neurotrópicos (Neal, 2014).

El genoma de los *Flavivirus* se constituye de un ARN monocatenario de polaridad positiva (el cual tiene función como mensajero) de aproximadamente 11,000pb, el cual codifica una poliproteína que es procesada pos-traduccionalmente, dando lugar a 3 proteínas

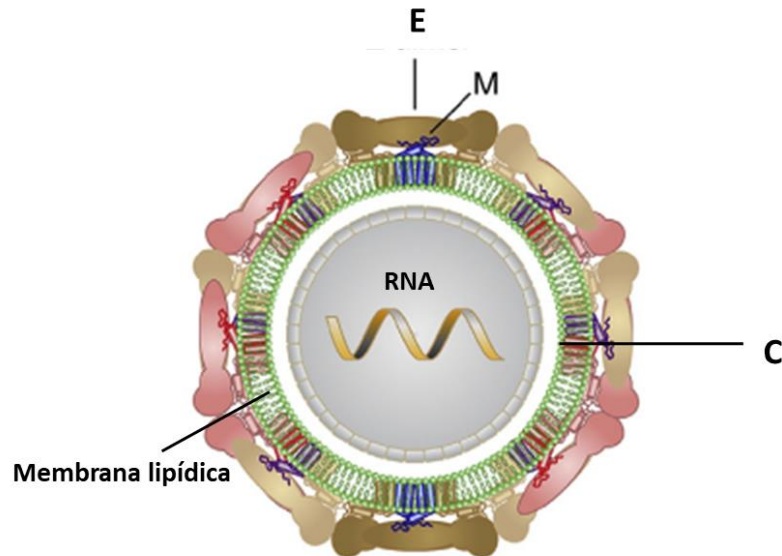
estructurales: la proteína E o de envoltura (que participa en la interacción e internalización del virus a la célula huésped), la proteína M o de membrana (la cual está involucrada el proceso de maduración del virus), y la proteína C o de Cápside (que interactúa con el genoma viral). El genoma de los *Flavivirus* también codifica 7 proteínas no estructurales denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, involucradas en el procesamiento de la poliproteína y el ensamblaje del virión (Kuhn, 2012).

Cada una de las proteínas no estructurales tiene una función diferente: la NS1 es necesaria para la replicación viral y la infección, además de que está involucrada en la evasión de la respuesta inmunológica; la NS3 contiene un dominio con función de proteasa y otro con función de helicasa, los cuales son importantes en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación respectivamente; la proteína NS5 también contiene dos dominios que son importantes en la replicación del material genómico del virus, uno de ellos actúa como enzima metil-transferasa que es responsable de la estructura cap del extremo 5', mientras que el otro dominio funge como polimerasa dependiente de RNA. Además de su función enzimática, la proteína NS5 puede antagonizar la respuesta del hospedero mediada por interferón (Shi y Gao, 2017).

El ZIKV puede tener una conformación madura (**figura 1**), con diámetro de aproximadamente 50nm. Esta conformación se caracteriza por la escisión del péptido "pr" de la proteína M mediante proteasas tipo furinas, además de la glicosilación de la proteína E en la asparagina 154 (Wen y cols., 2018), modificaciones que se llevan a cabo en la red trans-golgi. La conformación inmadura puede contener aun el péptido "pr" y



debido a ello, su diámetro es mayor (aproximadamente 60 nm) lo cual podría interferir en la interacción virus-hospedero (Rey y cols., 2017).



**Figura 1: Esquema de la estructura del virus Zika.** El ZIKV se conforma de tres proteínas que forman su estructura (E, M y C). En su forma madura, el ZIKV carece del péptido “pr” en la proteína M (modificada de Rey y cols., 2017)

### **B.I Ciclo de replicación viral**

La interacción inicial del virus con la membrana se presenta mediante la proteína E. Ésta se asocia a la membrana plasmática de la célula blanco y el virus es internalizado. La interacción entre el virus y la célula blanco puede estar mediada por receptores específicos como el DC-SIGN o CD209, los cuales están presentes en células dendríticas y macrófagos. El ZIKV también puede interactuar mediante los receptores de tirosina-cinasa TIM y TAM, particularmente el AXL. Sin embargo, la interacción ZIKV-

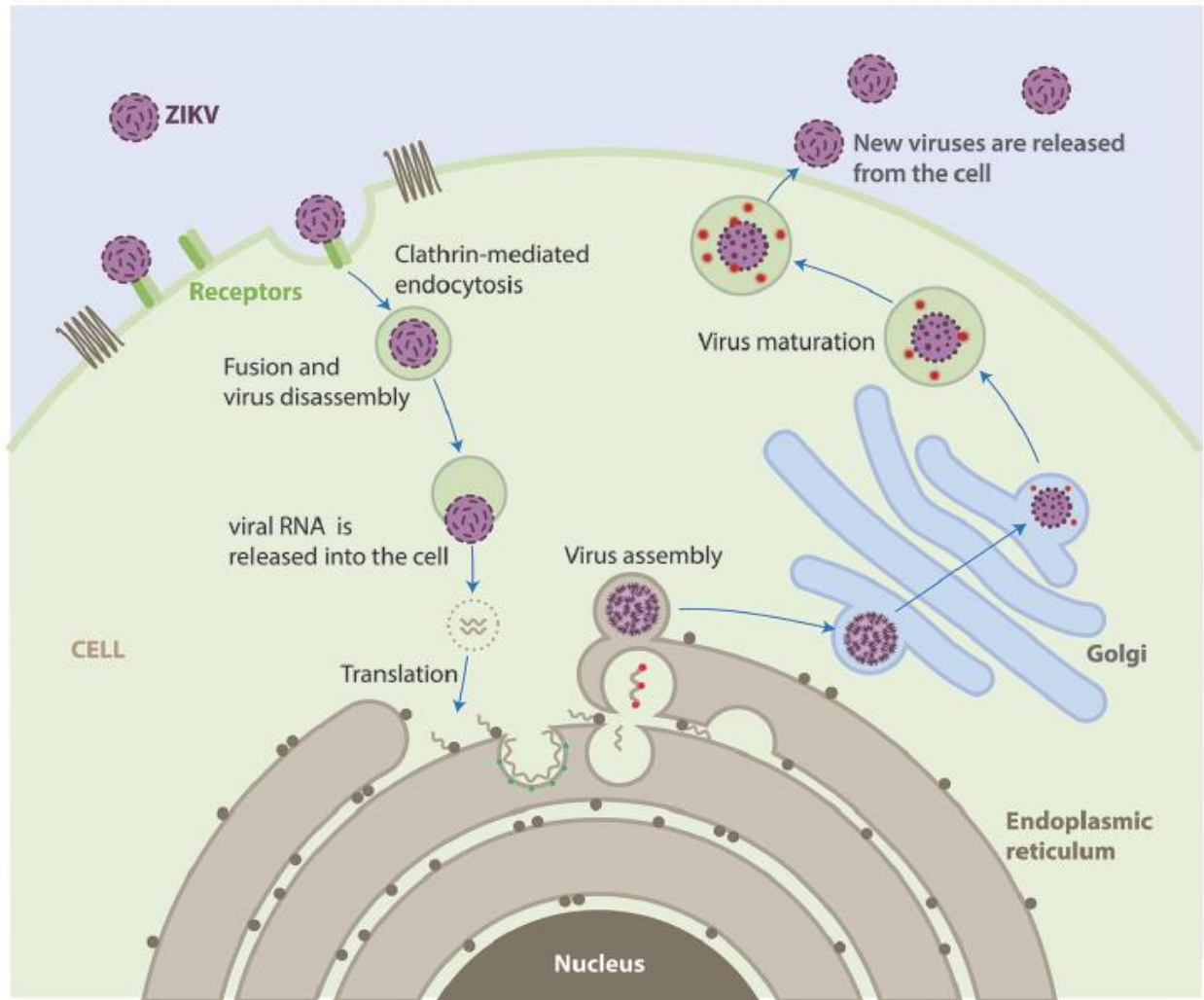
célula blanco también se puede presentar de forma independiente de receptor a nivel de sitios ricos en clatrina y balsas lipídicas de la membrana celular (Sirohi y Kuhn, 2017). El virus se internaliza por medio de endocitosis formando un endosoma temprano, el cual mediante actividad de ATPasa se acidifica promoviendo la fusión de la membrana del virus con la membrana del endosoma y con ello la liberación del genoma viral. El ARN viral es liberado al citoplasma celular y en el retículo endoplásmico se traduce la poli-proteína, la cual es procesada por proteasas tanto del virus como de la célula blanco; se replica el ARN y se ensambla el virión inmaduro (Kuhn, 2012; Sirohi y Kuhn, 2017). La maduración del virus se lleva a cabo en la red trans-golgi donde modificaciones como la escisión del péptido “pr” de la proteína de membrana y la glicosilación de la asparagina 154 (N154) en la proteína E (Wen y cols., 2018). Finalmente, el virión es liberado por medio de exocitosis, generando partículas maduras con capacidad infectiva, aunque también pueden liberarse partículas inmaduras (**figura 2**).

## **B.II Célula Blanco: Monocito**

El ZIKV tiene diferentes blancos celulares, entre los que encontramos células endoteliales, inmunológicas y del sistema nervioso central (neuronas y glía). Sin embargo, la principal célula diana del ZIKV es el monocito (Jurado e Iwasaki, 2017), sobre todo aquellos que expresan en su superficie los marcadores CD14<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup> (Milchmayer y cols., 2017; Foo y cols., 2017).

Los monocitos al ser infectados generan una respuesta de activación, en la cual además de generar citocinas pro-inflamatorias, se conoce que también se generan otros productos de activación como las vesículas extracelulares (EVs), entre éstas se

encuentran los exosomas (Martinez-Rojas, 2017). Las EVs pueden tener efectos distintos órganos y sistemas, por ejemplo, a nivel de sistema nervioso central.



**Figura 2. Ciclo de replicación del virus Zika.** El ZIKV interactúa con la célula blanco, es endocitado se replica y ensambla en el retículo endoplásmico, madura en la red trans-golgi y finalmente es exocitado (Acosta-Ampudia y cols., 2018).

Las EVs de los monocitos activados pueden promover diferentes mecanismos en la célula con la que tienen contacto, por ejemplo, pueden estar involucradas en

inmunorregulación, en la activación de diferentes vías de señalización, transporte de moléculas cargo, incluso en la activación de la célula, como es el caso de las células endoteliales (Gebraad y cols., 2018).

### **C. Vesículas Extracelulares**

Las EVs son partículas liberadas por células, delimitadas por una bicapa lipídica, incapaces de replicarse y que transportan moléculas biológicas funcionalmente activas (Sterzenbach y cols., 2017) como proteínas y ácidos nucleicos. Las EVs son liberadas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y tienen un papel fundamental en la comunicación inter-celular (Gyorgy y cols., 2011). Se pueden clasificar por su origen, tamaño y composición bioquímica (Thery y cols., 2018). De acuerdo con su tamaño actualmente se proponen dos clasificaciones: las VEs grandes (large extracellular vesicles) o micropartículas (MPs), que son mayores a 200nm de diámetro; y las EVs pequeñas (small extracellular vesicles) o también conocidas como exosomas, que tienen un diámetro menor a 200nm (Thery y cols., 2018).

En cuanto a su biogénesis, las micropartículas derivan de la membrana plasmática, y presentan un recambio en los fosfolípidos, es decir, presentan fosfolípidos aniónicos en su superficie como fosfatidilserina. En particular, la fosfatidilserina se utiliza como marcador de micropartículas, detectándose mediante anexina-V. Los exosomas provienen de la ruta endosomal, y se generan a través de diversas rutas. Los marcadores utilizados mayormente para la detección de los exosomas son las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9, así como la proteína de choque térmico Hsp70 (Thery y cols., 2018; Van Niel y cols., 2018).

## **C.I Biogénesis de los exosomas**

La producción de exosomas es un proceso complejo que depende de cada tipo celular y las condiciones en las que se encuentren. El mecanismo mayormente descrito es la vía endosomal dependiente de los complejos endosomales requeridos para el transporte (ESCRT por sus siglas en inglés) que van del ESCRT-0 al ESCRT-III (Juan y Fürthauer, 2018). Sin embargo, existen vías conocidas como “independientes de ESCRT”, por ejemplo, en la que se origina a partir de la esfingomielina (Verderio y cols., 2018).

Los exosomas son generados a partir de sitios ricos en tetraspaninas, así como de balsas lipídicas que se encuentran en la membrana plasmática, a partir de esos sitios se forma el endosoma temprano. El complejo ESCRT 0 se une a las proteínas ubiquitinadas en el endosoma temprano y recluta al complejo ESCRT 1, posteriormente el complejo ESCRT II se recluta por el I, promoviendo la formación de una invaginación en el endosoma y la selección de las biomoléculas que serán el cargo de las vesículas. El complejo ESCRT III promueve la escisión para dar lugar a la vesícula intraluminal (ILV) (Daßler-Plenker, y cols., 2020). Las ILVs están contenidas en una vesícula de mayor tamaño, denominada cuerpo multivesiculado (MVB). El MVB puede irse hacia degradación, es decir por la vía lisosomal o puede seguir la vía secretoria, dando lugar a la secreción de exosomas. Lo anterior depende del contenido de lípidos como el colesterol, así como del cargo de las vesículas. En el caso de la vía secretoria, el MVB es dirigido hacia la membrana plasmática mediante la acción de GTPasas pequeñas de la familia Rab, como Rab27. Finalmente, el MVB se fusiona con la membrana plasmática, proceso que podría ser mediado por SNAREs, (las moléculas involucradas en el tráfico vesicular dependen de

cada célula) para dar lugar a la liberación de los exosomas (**figura 3**) (Robbins y Morelli, 2014).

Los exosomas juegan un papel importante en la intercomunicación celular, ya que pueden contener diversas moléculas biológicamente activas como proteínas y ácidos nucleicos. Las moléculas cargo dependerán de la célula de la cual se originó el exosoma y la condición, es decir, si las condiciones son fisiológicas o patológicas (Andaloussi y cols., 2013). Recientemente se ha visto que podrían estar implicados en la diseminación del virus o sus productos durante la infección viral (Khan y cols., 2017).

### **C.II Vesículas extracelulares en condiciones patológicas**

En condiciones de infección, se sabe que puede presentarse un proceso proinflamatorio, por lo que, las vesículas extracelulares derivadas de macrófagos pueden contener moléculas proinflamatorias, las cuales podrían estimular y activar a las células con las que interactúan (Nagano y cols., 2019). Algunas de las proteínas cargo de las vesículas extracelulares, como citocinas pro-inflamatorias pueden activar a otros tipos celulares. Un ejemplo de ello es la proteína de choque térmico HSP70 que se ha visto que puede activar la vía del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) la cual, por consiguiente, estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias (Nagano y cols., 2019).

Li y colaboradores (2018) demostraron que estimular ratones con lipopolisacáridos (LPS), aumentaba el número de exosomas circulantes en sangre y que éstos podrían estar implicados en la neuroinflamación. Para comprobarlo, aislaron exosomas de la sangre del ratón estimulado y los inocularon en otro ratón, en el cual también observaron aumento de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) y de los marcadores gliales Iba-1

y GFAP en el tejido cerebral, posterior al estímulo con exosomas. Lo anterior sugiere que los exosomas podrían ser mediadores de neuroinflamación (Li y cols., 2018).

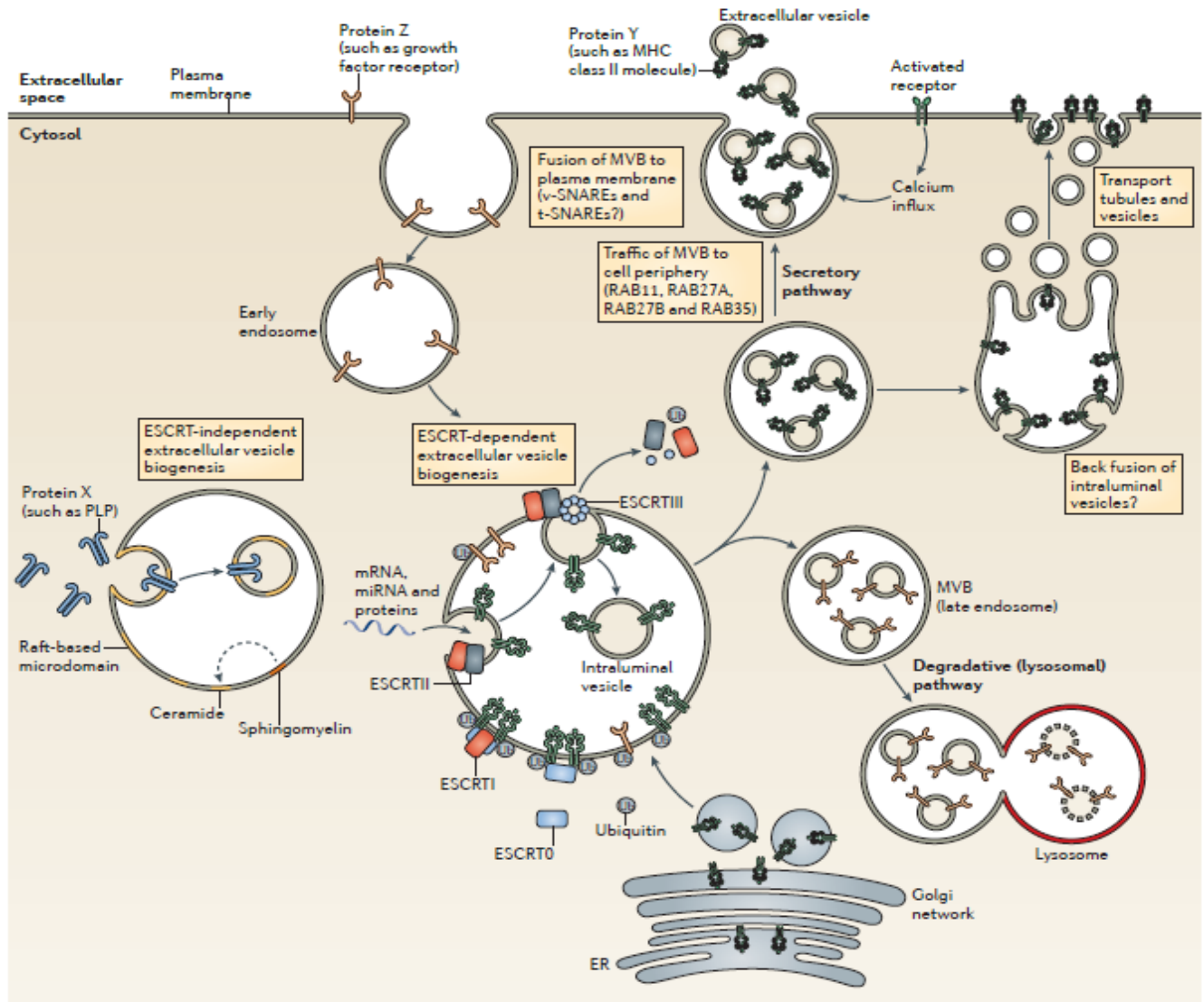
Actualmente las vesículas extracelulares, y en especial los exosomas han tomado gran relevancia también en el estudio del cáncer, ya que pueden ser importantes en la comunicación y el mantenimiento del microambiente tumoral (Daßler-Plenker y cols., 2020). También se han propuesto como marcadores de diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (You, y Ikezu, 2019), ya que éstos podrían liberarse desde el parénquima cerebral hacia el torrente sanguíneo, pasando a través de la BHE sin algún problema, y por lo tanto pueden ser detectados en el torrente sanguíneos, propuestos como una biopsia líquida (Li y cols., 2019).

### **C.III Papel de las EVs en la infección viral**

Anteriormente los exosomas eran vistos como desechos celulares, sin embargo, actualmente se conoce su papel en la intercomunicación y el mantenimiento de la fisiología celular. Recientemente también se ha reconocido su participación durante la infección viral. La biogénesis de los exosomas puede ser “aprovechada” por partículas virales para incorporar componentes virales como proteínas y ácidos nucleicos (Khan y cols., 2017).

En nuestro grupo de investigación hemos encontrado que durante la infección de monocitos humanos con DENV, las células se activan, incrementando la producción de EVs de origen monocitario (MPs y exosomas), las cuales favorecen la producción de

citocinas pro-inflamatorias y de proteínas de adhesión celular (Martínez-Rojas, 2017; Mateos-Rodríguez, 2016; Rodríguez-Murcia, 2017).



**Figura 3.** Biogénesis de exosomas (small extracelular vesicles). Formación del endosoma temprano, seguido de la formación del cuerpo multivesiculado mediante la vía dependiente de ESCRT (Robbins y Morelli, 2014).



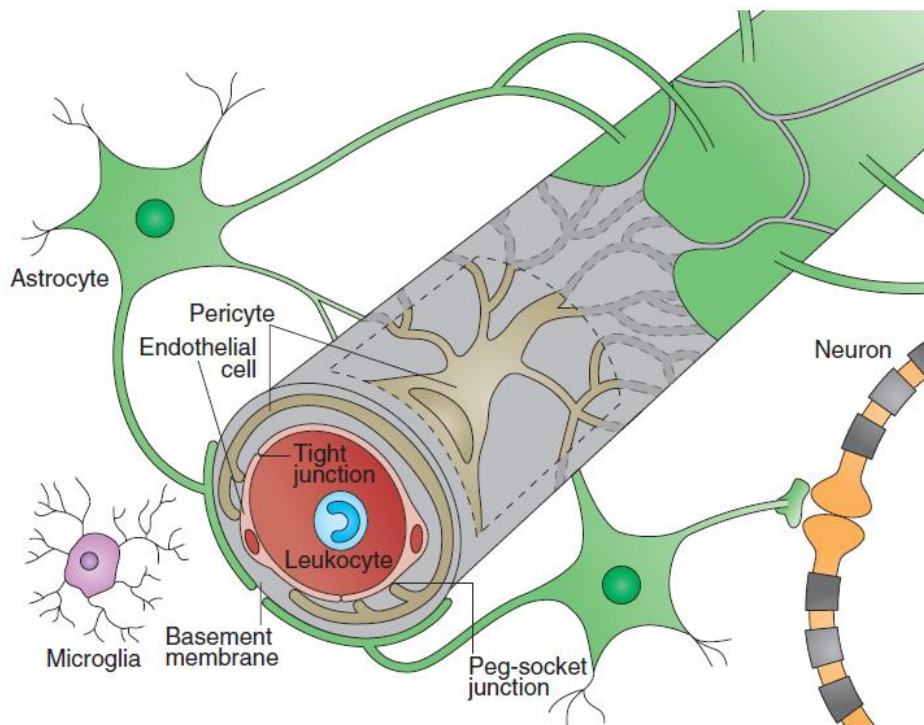
Martinez-Rojas y cols., (2020) demostraron que células de mosquito infectadas por ZIKV producen EVs, entre éstas exosomas, los cuales mostraron contener moléculas virales, ya que en ellos se detectó la presencia de la proteína viral E, y también se detectó material genómico del virus, lo que sugiere que podrían estar actuando como vehículos troyanos, es decir, que los exosomas pueden ser vehículos que transporten virus de una célula a otra sin que éste sea detectado. Los exosomas derivados de células de mosquito infectadas por ZIKV, tienen la capacidad de infectar y activar a monocitos y células endoteliales. Este trabajo podría indicar que el ZIKV podría transmitirse mediante exosomas. Por otro lado, se reportó que los exosomas derivados de neuronas corticales infectadas por ZIKV, son capaces de transmitir el virus a neuronas no infectadas, lo cual confirma que el ZIKV es transmitido por exosomas, y además determinan que el virus induce la producción de exosomas mediante la estimulación de la esfingomielinasa, la cual está involucrada en la biogénesis exosomal en la vía independiente del complejo ESCRT (Zhou y cols., 2019)

#### **D. *Flavivirus* y barrera hematoencefálica**

Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los virus que se agrupan en el género de los *Flavivirus* tienen tropismo hacia SNC, como WNV, JEV, DENV, teniendo blancos celulares a neuronas, astrocitos y/o microglía. Para poder infectar células pertenecientes a este sistema, es necesario que los virus logren pasar a través de la barra hematoencefálica (BHE), estructura altamente selectiva encargada de brindar protección al cerebro.

## D.I Estructura de la barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE es una barrera física y química que regula el intercambio de distintas moléculas entre el flujo sanguíneo y el parénquima cerebral, por lo cual es una barrera altamente selectiva que presenta una permeabilidad muy baja, respecto a otros endotelios (Greene y Campbell, 2016). La BHE se localiza a nivel de la microvasculatura cerebral. Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral están rodeadas por pericitos y a su vez por una lámina basal, en la que están embebidos los pies de los astrocitos y muy cercanamente al capilar se encuentran las células de la microglía (**figura 4**).



**Figura 4. Esquema de la barrera hematoencefálica.** Se observa que la BHE está conformada por el capilar que se rodea de pericitos, astrocitos y microglía (Obermier B y cols., 2013).

Las células endoteliales se unen entre sí a través de las uniones estrechas, formadas principalmente por las proteínas claudina-5 (Cldn-5), zónula ocludens (ZO-1) y ocludina.

Este tipo de uniones regulan el flujo paracelular, es decir, entre una célula endotelial y otra; únicamente moléculas no cargadas menores a 4.5Å o moléculas liposolubles pueden tener libre acceso (Lossinsky y Shivers, 2004; Forster, 2008). Otra característica que regula la permeabilidad es que, a diferencia de otros endotelios, la BHE carece de fenestraciones y posee un bajo grado de pinocitosis (Castro y cols., 2019). A pesar de que la BHE es una de las barreras biológicas más selectivas, puede presentar alteraciones en su estructura y composición, lo cual afecta su permeabilidad.

#### **D.II Alteraciones de la barrera hematoencefálica**

La estructura de la BHE puede verse afectada y aumentar su permeabilidad en eventos adversos, tanto infecciosos como no infecciosos, que generalmente se presentan en un contexto neuroinflamatorio.

En procesos no infecciosas, por ejemplo, isquemia cerebral (Yang y cols., 2019) o la pérdida de sueño (Hurtado-Alvarado G y cols., 2016; Hurtado-Alvarado G y cols., 2017), se ha descrito aumento en la permeabilidad de la BHE en ratas y ratones macho, en los cuales además hubo aumento en moléculas pro-inflamatorias y de activación glial de forma diferencial en las regiones cerebrales evaluadas.

Se ha reportado que durante el proceso neuroinflamatorio (encefalitis), como los causados durante la infección por algunos virus (Liu y cols., 2008; Dropulic y Marsters, 1989), hay aumento en la permeabilidad de la BHE, lo cual se ha descrito que puede ser favorecido por citocinas pro-inflamatorias. Durante la infección por JEV se ha descrito que hay disminución en la expresión de las proteínas de unión estrecha, así como el aumento de los marcadores de glía reactiva GFAP e Iba-1, marcador de astrocitos y

microglía, respectivamente (Gupta y Pulliam, 2014). Además de esto, en la infección por WNV aumentan las proteínas de adhesión celular como I-CAM, VCAM-1 y E-selectina (Roe K y cols., 2014).

En otro estudio se describió que la neuroinflamación inducida por el JEV, antecede al aumento de la permeabilidad de la BHE en un modelo *in vivo*, en donde observaron que durante los tres primeros días de infección, la concentración viral en la sangre se mantenía en niveles elevados, mientras que a partir del cuarto día de infección, el título viral había disminuido sin embargo los marcadores proinflamatorios se encontraban elevados en SNC al igual que la permeabilidad de la BHE, por lo que concluyen que el proceso neuroinflamatorio promueve el aumento en la permeabilidad de la BHE (Li F y cols., 2015).

En el contexto de las EVs, Zhou y cols. (2018) demostraron que en un modelo *in vitro* de infección por flavivirus transmitidos por garrapatas (TBF) los exosomas pueden ser utilizados como mecanismo de transporte de partículas virales e incluso que pueden atravesar la BHE. Durante la infección de monocitos por ZIKV, se podrían generar EVs que contribuyan a la activación de diferentes células diana (Mateos-Rodríguez, 2016), entre ellas las células del sistema nervioso central (neuronas, astrocitos, microglía, oligodendrocitos), así como a las células endoteliales que forman la BHE favoreciendo un estado pro-inflamatorio a nivel del SNC.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del género *Flavivirus* se encuentran virus con tropismo al sistema nervioso central como el WNV, JEV y el DENV, los cuales pueden provocar encefalitis y alteración de la BHE, favoreciendo un aumento en la permeabilidad de ésta (Li y cols., 2015; Neal, 2014; Roe y cols., 2014). El ZIKV también ha mostrado inducir encefalitis y daños al sistema nervioso, como la microcefalia y autoinmunidad (Acosta-Ampudia y cols., 2018; Mlakar y cols., 2016; Muñoz y cols., 2017). Sin embargo, poco se sabe sobre su efecto en la BHE (Mladinich y cols., 2017) en modelos *in vivo*.

Se sabe que el ZIKV tiene como principal célula blanco al monocito (Foo y cols., 2017). Los monocitos activados (como podría suceder durante la infección por ZIKV) producen citocinas proinflamatorias, así como vesículas extracelulares entre las que se encuentran los exosomas (Gebraad y cols., 2018), los cuales pueden transferir biomoléculas activas (proteínas y/o RNA) o partículas virales completas, contribuyendo con la diseminación del ZIKV (Martinez-Rojas y cols., 2020), incluso a nivel de SNC (Zhou y cols., 2019).

En condiciones patológicas, los exosomas de monocitos circulantes pueden activar diversas células, por ejemplo, las células de la microvasculatura, repercutiendo en la permeabilidad del endotelio. Los exosomas liberados se pueden fusionar con las membranas de la célula receptora o bien, pasar a través de ella (trancitosis), llevando el cargo al otro lado del vaso sanguíneo, por ejemplo, hacia el parénquima cerebral, lo cual podría desencadenar la activación de células gliales o neuronas (Saeedi y cols., 2019).

Se desconoce cuál es el papel de los exosomas derivados de monocitos, a nivel de sistema nervioso central en cuanto a la permeabilidad de la BHE y al proceso neuroinflamatorio en el contexto de la infección por ZIKV en un modelo *in vivo*.

## **5. HIPÓTESIS**

Los exosomas de monocitos infectados por ZIKV, inducen aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y el proceso neuroinflamatorio en un modelo murino.

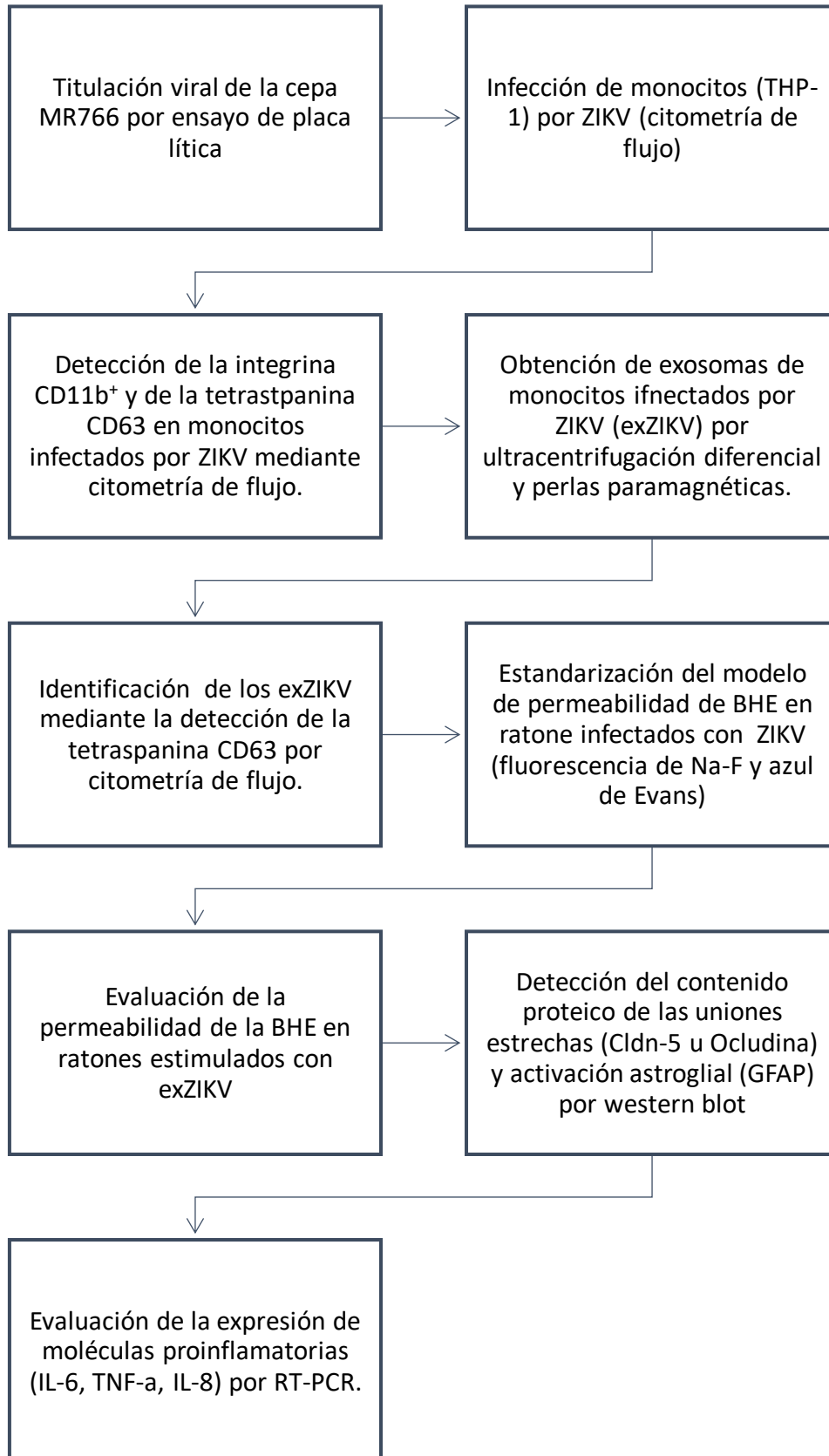
## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de los exosomas de monocitos humanos (THP-1) infectados por ZIKV en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica así como en el proceso neuroinflamatorio en un modelo *in vivo*.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Titular y amplificar la cepa del virus Zika (ZIKV) MR766 en células Vero.
2. Establecer las condiciones óptimas de infección de monocitos humanos (THP-1) mediante la detección del antígeno viral por citometría de flujo.
3. Evaluar la activación de los monocitos infectados por ZIKV mediante la detección de la integrina CD11b.
4. Detectar la tetraspanina CD63 en monocitos infectados por ZIKV.
5. Aislar e identificar los exosomas de monocitos infectados por ZIKV (exZIKV).
6. Estandarizar condiciones óptimas de infección con ZIKV en un modelo murino (BALB/c) de permeabilidad de BHE.
7. Evaluar la permeabilidad de la BHE en ratones estimulados con exZIKV en las regiones cerebrales subcorticales, corteza y cerebelo.
8. Evaluar en cerebelo, corteza y regiones subcorticales de ratones estimulados con exZIKV la presencia de proteínas de unión estrecha (Claudina-5 u ocludina) y la activación glial (GFAP).
9. Determinar la expresión de las moléculas proinflamatorias IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ .

## 8. DISEÑO EXPERIMENTAL





## 9. METODOLOGÍA

**Cultivos celulares y virus.** Se utilizaron células de epitelio renal de mono *Cercopithecus aethiops* (Vero, ATCC CCL-81), para la titulación y amplificación viral. Las células Vero se mantuvieron con medio DMEM (Biowest). Se utilizaron monocitos humanos provenientes de la línea celular THP-1 de sangre periférica (ATCC TIB-202) que se mantuvieron con medio de cultivo RPMI-1640 (Biowest). A los medios se les agregó solución de antibióticos 100X (10,000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B, Biological Industries) y se suplementaron con 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (SFB, Biowest) y 1% de L-glutamina 200 mM (Biowest). Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> (Series 8000 WJ CO<sub>2</sub>, Thermo Fisher Scientific). Se utilizó la cepa africana del virus Zika (ZIKV) proveniente del mono *Macacus rhesus* (MR766).

**Titulación del ZIKV por ensayo de placa lítica.** Se cultivaron células vero ( $1.0 \times 10^5$  células/pozo) en placas de cultivo de 24 pozos (Corning) y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta un 95% de confluencia (por duplicado). Cada pozo se inoculó con 0.1 mL de ZIKV previamente diluido en series logarítmicas base 10 (de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-22}$ ) en medio DMEM sin suplementar. Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por 2 h. Se removió el inóculo viral y cada pozo fue lavado dos veces con PBS 1X (pH 7.4). Los pozos fueron recubiertos con 1 mL de medio DMEM suplementado con 2.5% de SFB y 1% de metilcelulosa y se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta la formación de placas. Posteriormente se retiró la metilcelulosa; las células se fijaron con metanol al 96% por

15 minutos y se tiñeron con cristal violeta al 1% por 15 min en agitación constante, a temperatura ambiente.

El título vital se expresó en unidades formadoras de placa (UFP) por mL, y se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:  $UFP = \frac{N}{(V * D)}$  en donde N corresponde al promedio de placas contadas en la última dilución en que se observan bien definidas; V al volumen inoculado de la dilución viral (en ml) y D a la dilución menos concentrada en que las placas fueron contadas.

**Amplificación de ZIKV.** La amplificación viral se llevó a cabo en células Vero, utilizando un volumen de 5 ml del Stock ( $1 \times 10^{23}$  UFP/mL) de ZIKV, en cajas de cultivo F75 (Corning) a un 90% de confluencia, e incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por 2 h. Se retiró el inóculo viral y se agregaron 20 ml de medio DMEM suplementado al 10% con SFB y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta que se observó la formación de sincicios en el 90% del cultivo. La monocapa de células infectadas fue desprendida por dos ciclos de congelación-descongelación a 4 °C y por fuerza mecánica a través de un raspador de células (Corning). El medio de cultivo resultante de esta infección almacenado a -70 °C hasta su uso.

**Infección en monocitos humanos THP-1 con ZIKV:** Para determinar la condición de infección óptima en monocitos humanos THP-1, se utilizaron 3 multiplicidades de infección (MOI): MOI 3, MOI 1 y MOI 0.5. El inóculo viral se diluyó medio RPMI-1640 (Biowest). Se agregó 1.0 mL de la dilución correspondiente para cada MOI en cada pozo y se inocularon  $2.5 \times 10^5$  células/pozo en placas de 12 pozos. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por 2 h. Posteriormente se agregaron 1.5ml de medio

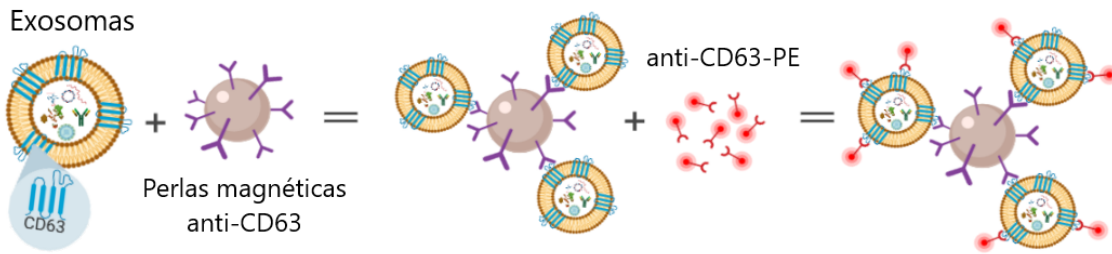
RPMI complementado al 10% con SFB. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Citometría de flujo de monocitos humanos THP-1 infectados por ZIKV.** Después de la infección, las células fueron fijadas con paraformaldehído (2%), y posteriormente fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% durante 30 minutos y se incubaron con diferentes anticuerpos: para evaluar la infección viral las células fueron incubadas con anticuerpo primario anti-ZIKV durante toda la noche, y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse acoplado a Alexa-555; para evaluar la activación de las células infectadas se incubó con anti-CD11b (acoplado a ficoeritrina) y para la detección de la tetraspanina CD63, las células fueron incubadas con anti-CD63 (acoplado a ficoeritrina), en ambos casos la incubación fue durante dos horas, a temperatura ambiente, en agitación y en condiciones de oscuridad. Las células fueron lavadas para eliminar el exceso de anticuerpo, y se trasladaron a tubos para citómetro. La detección de la infección, de la integrina CD11b y de la tetraspanina CD63 se llevó a cabo mediante citometría de flujo, utilizando el equipo FACSCALIBUR en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo de la UNAM (LabNaICit-UNAM). Los datos fueron analizados mediante el software FlowJo v10.

**Suero Fetal Bovino libre de exosomas.** Para el aislamiento de exosomas se utilizó SFB libre de exosomas, el cual se obtuvo por centrifugación (900x *g*/10 minutos), fue filtrado (0.22µm). Se ultracentrifugó en rotor SW28 a 120,000x *g* durante 18 horas, y posteriormente se hicieron alícuotas. Se preparó medio de cultivo con 5% de SFB libre de exosomas, el cual se utilizó para los experimentos de extracción de exosomas.

**Extracción de exosomas de monocitos humanos THP-1 infectados con ZIKV.** Se sembraron 20 millones de monocitos (THP-1) por condición (Mock, 48 y 72 horas post.infección) y se infectaron con un equivalente a 8 millones de partículas virales (MOI 0.5) de ZIKV (como se describió anteriormente) y con aproximadamente 25 ml de medio de cultivo (RPMI + 5% de SFB libre de exosomas). Transcurrido el tiempo post-infección se colectaron células y el medio de cultivo en tubos cónicos, se centrifugaron a 900 x *g* por 10 minutos, seguido de otra centrifugación a 2000 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se trasladó a tubos para rotor SW28 y se ultracentrifugó a 10,000 x *g* por 35 minutos, posteriormente el sobrenadante se ultracentrifugó dos veces a 120,000 x *g* durante 70 minutos. Se descartó el sobrenadante, y al precipitado se le agregaron 3ml de PBS IX frío (4°C), se homogenizó y se almacenó en alícuotas a -70°C hasta su uso.

**Aislamiento de exosomas de monocitos humanos THP-1 infectados con ZIKV.** Se tomaron 200µl de los exZIKV extraídos de cada condición y se le agregaron 40µl de perlas paramagnéticas-CD63 y se incubaron para el acoplamiento durante aproximadamente 18 horas, en agitación a 4°C. Transcurrido el tiempo de acoplamiento, los tubos con las muestras se colocaron en el imán y se retiró el sobrenadante, para posteriormente llevar a cabo una serie de lavados con PBS IX-BSA 0.5%, de tal forma que únicamente queden los exosomas acoplados al CD63 de las perlas paramagnéticas (**figura 5**). Se agregó el anticuerpo primario anti-CD63 (ya acoplado a ficoeritrina) en una dilución 1:20, durante 1 hora. Se realizaron varios lavados con PBS IX-BSA 0.5%, y se cuantificó mediante citometría de flujo. Los datos fueron analizados con el software FlowJo v10.



**Figura 5.** Esquema del aislamiento de exosomas mediante perlas paramagnéticas acopladas a anti-CD63.

**Animales experimentales:** En el presente estudio se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c con un peso de 20-25 gr, los cuales se obtuvieron de la Unidad de Manejo de Modelos Biológicos. Se colocaron en grupos de 4-6 ratones por caja, con alimento y agua *ad libitum*. Los ratones fueron tomados aleatoriamente para cada condición experimental. Los procedimientos experimentales y el proyecto fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) bajo el protocolo 6316.

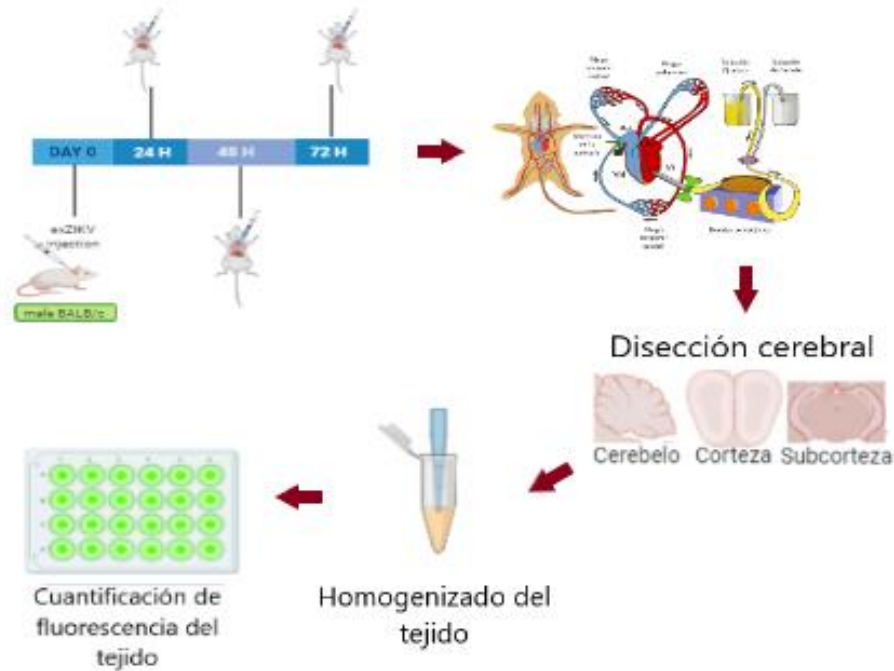
**Estandarización de condiciones óptimas de infección en modelo de permeabilidad de BHE *in vivo*.** Se evaluaron 6 condiciones experimentales, además de la condición control (n=3):  $10^7$ ,  $10^5$ , y  $10^3$  UFP evaluadas a 24, 48 o 72 horas posterior a la administración del inóculo viral vía intraperitoneal (i.p.). Transcurridos los días post-infección, los ratones fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico y posteriormente se les administraron los trazadores: sodio acoplado a Fluoresceína (Na-F; SIGMA F6377) en una concentración de 10mg/ml y azul de Evans (SIGMA E2129) en

una concentración de 1 mg/ml, administrados vía intracardiaca y se dejaron en circulación 3 minutos, posteriormente los ratones fueron perfundidos con solución salina al 0.9% durante 3 minutos.

Se extrajeron las regiones cerebrales cerebelo, corteza y áreas subcorticales (hipocampo y ganglios basales). Las muestras cerebrales fueron homogenizadas con PBS 1X; se centrifugaron a 13500 rpm/10 minutos y al sobrenadante se le agregó metanol y se centrifugó nuevamente a 13500rpm/10 minutos. El sobrenadante se colocó en placas de 96 pozos y se cuantificó por fluorescencia (**figura 6**): con un rango de excitación de 485nm y emisión 535nm para Na-F; para azul de Evans un rango de excitación 535nm y emisión 595nm.

**Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en presencia de exZIKV.** Se realizó determinación de proteína de cada alícuota de las muestras de exosomas (exZIKV) mediante microensayo de BCA (ácido bicinconínico), utilizando una curva patrón de BSA. Las muestras se irradiaron en tres ciclos consecutivos de luz UV a 1200  $\mu$ J (x100) con Stratalinker 1800 (Stratagene) para inactivar partículas virales que permanezcan en la muestra (Martínez-Rojas y cols., 2020). Se administraron 25 o 50 $\mu$ g de proteína de exZIKV a ratones BALB/c por vía i.p., ambas concentraciones se evaluaron a las 48 y 72 horas (n=3). Transcurrido el tiempo se realizaron ensayos de permeabilidad de BHE. Por otra parte, se inocularon exosomas provenientes de monocitos no infectados (exMock) en la condición seleccionada anteriormente de exZIKV (25 $\mu$ g de proteína a las 48 horas post-administración) y de igual forma se llevaron a cabo ensayos de permeabilidad a Na-F y a azul de Evans.

**Determinación de proteínas en tejido cerebral.** Se utilizaron ratones macho BALB/c intactos e inoculados con ZIKV, exZIKV y exMock (n=3) y 48 horas posteriores a la inoculación, fueron sacrificados mediante decapitación. Se extrajo el tejido cerebral, se disecaron las regiones cerebelo, corteza y regiones subcorticales y se colocaron en rápidamente a -20°C para evitar degradación proteica. Posteriormente se homogenizaron con RIPA (buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación) más inhibidores de proteasa; se centrifugaron a 13500 rpm durante 10 minutos. Se hicieron alícuotas con el sobrenadante, y posteriormente se realizó determinación de proteína utilizando el método de Bradford.



**Figura 6.** Esquema de ensayos de permeabilidad de BHE en modelo *in vivo*. El modelo consiste en la administración del estímulo y transcurrido el tiempo determinado, se lleva a cabo los ensayos de permeabilidad, se extrae el tejido cerebral, se homogeniza el tejido y se cuantifica la cantidad del trazador por gr de tejido cerebral.

**Evaluación de la presencia de proteínas de unión estrecha.** Para evaluar los cambios en la presencia de proteínas de unión estrecha se llevó a cabo western blot. Se cargaron 100µg de proteína en un gel de poliacrilamida (10%), y después de la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante aproximadamente 90 min (70V). La membrana se bloqueó con leche descremada (5%) y PBST (PBS 1X + Tween 20 0.1%) durante 30 min; posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-Cldn-5 (bio16046) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido el tiempo se realizaron lavados y se incubó con el anticuerpo secundario (Vector Laboratories: VEC.BA-1100) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, seguido de lavados con PBST. La membrana se incubó con el complejo avidina-biotina durante 30 minutos; se realizaron lavados con PBST y se le agregó luminol. Finalmente se reveló con el equipo C-Digit y el software image studio digits V.3.1.

**Evaluación la expresión de marcadores inflamatorios.** La evaluación de la expresión de marcadores inflamatorios se hizo mediante RT-PCR, para ello se utilizaron ratones intactos y ratones inoculados con ZIKV, exZIKV y exMock. Posterior a la inoculación (48 h), los ratones fueron decapitados; se extrajo el tejido cerebral y se diseccionaron las regiones ya mencionadas. Se agregó 1ml de trizol en cada región y se guardaron a -70°C. Posteriormente se adicionaron 200µl de cloroformo, se centrifugó a 12000xg a 4°C durante 15 minutos y se separó la fase acuosa. Se le agregaron 0.5ml de isopropanol y se homogenizó, se incubó hasta la formación del precipitado y se centrifugó nuevamente la muestra 12000xg 10 minutos, y al precipitado se le agregó 1 de etanol al 75%. Se centrifugó a 7500g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 100ul de agua tratada con DEPC. Posteriormente se cuantificó el RNA



mediante nanodrop y mediante el kit one step (OneStep RT-PCR kit, Qiagen) se llevó a cabo la RT-PCR para los genes TNF- $\alpha$ , GAPDH, IL-6 e IL-8. Las sondas empleadas fueron las siguientes (Mfg. ID 110182256, IDT, USA),:

**TNF- $\alpha$**  FW [5'-ACAAGCCTG-TAGCCCATGTT-3'], RV [5'-AAAGTAGACCTGCCC-AGACT-3']; **GAPDH** FW [5'-CCATGTTTCGTCATGG-GTGTGAACCA-3'], RV [5'-GCCAGT-AGAGGCAGGGATGATGTTTC-3']; **IL-6** FW [5'-GTCTGAAAGCAGCAAAGAGGC-3'], RV [5'-CTGGAGGTACTCTAGGTATAC-3']; **IL-8** FW [5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT3'], RV [5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTCGAG-3'];

Se evaluaron mediante gel de agarosa (al 1.2% teñido con BrEt al 2%) y se visualizaron mediante el equipo Typhoon FLA 9500. Las imágenes fueron a analizadas con el software ImageJ.

**Análisis estadístico.** La significancia estadística se determinó mediante la prueba de análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) con Tukey's como un análisis post hoc para ANOVA. Los valores de P inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativo. Para los gráficos se utilizó GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Los datos cuantificados se presentan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

## 10. RESULTADOS

### Titulación del ZIKV por ensayo de placa lítica.

Para conocer la concentración del stock viral del ZIKV (MR766), se utilizó la técnica del ensayo de placa lítica en células Vero (**figura 7**), a las cuales se les agregó un volumen de 0.450 mL del inóculo viral. Observamos que la dilución de  $1 \times 10^{-8}$  fue la última en la que se observó la formación de placas líticas. La concentración o título viral se expresó en unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro que se obtuvo utilizando la siguiente

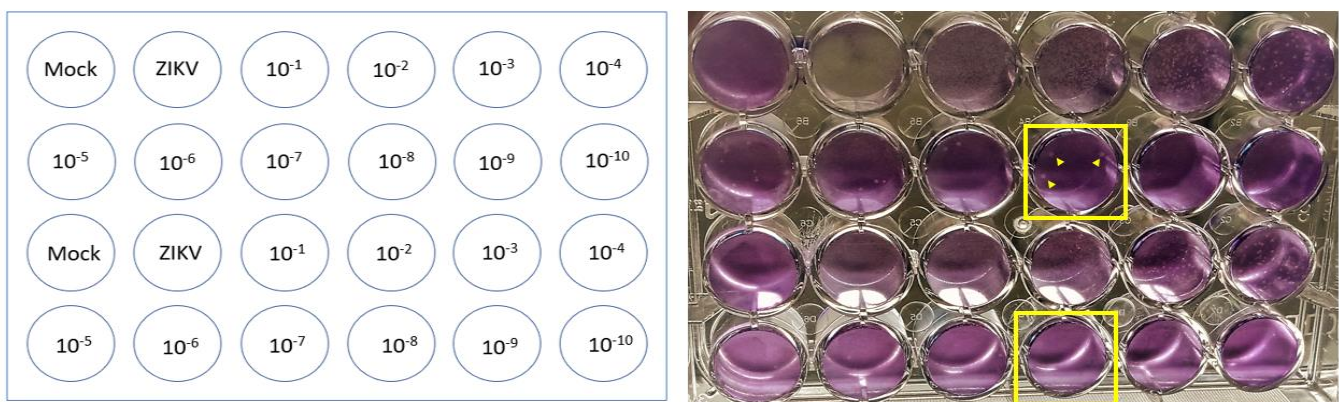
$$\text{fórmula: } UFP/mL = \frac{N}{V * D}$$

En donde N es el promedio de placas líticas contadas en  $1 \times 10^{-8}$  ( $n_1=3$  y  $n_2=0$ ); V es el volumen del inóculo viral y D, la última dilución en la que se observaron las placas líticas.

Sustituyendo los valores en la fórmula obtenemos lo siguiente:

$$UFP/mL = \frac{1.5}{0.450 \times 10^8} = 3.3 \times 10^8.$$

Por lo tanto, el título viral estimado fue  $3.3 \times 10^8$  UFP/mL.

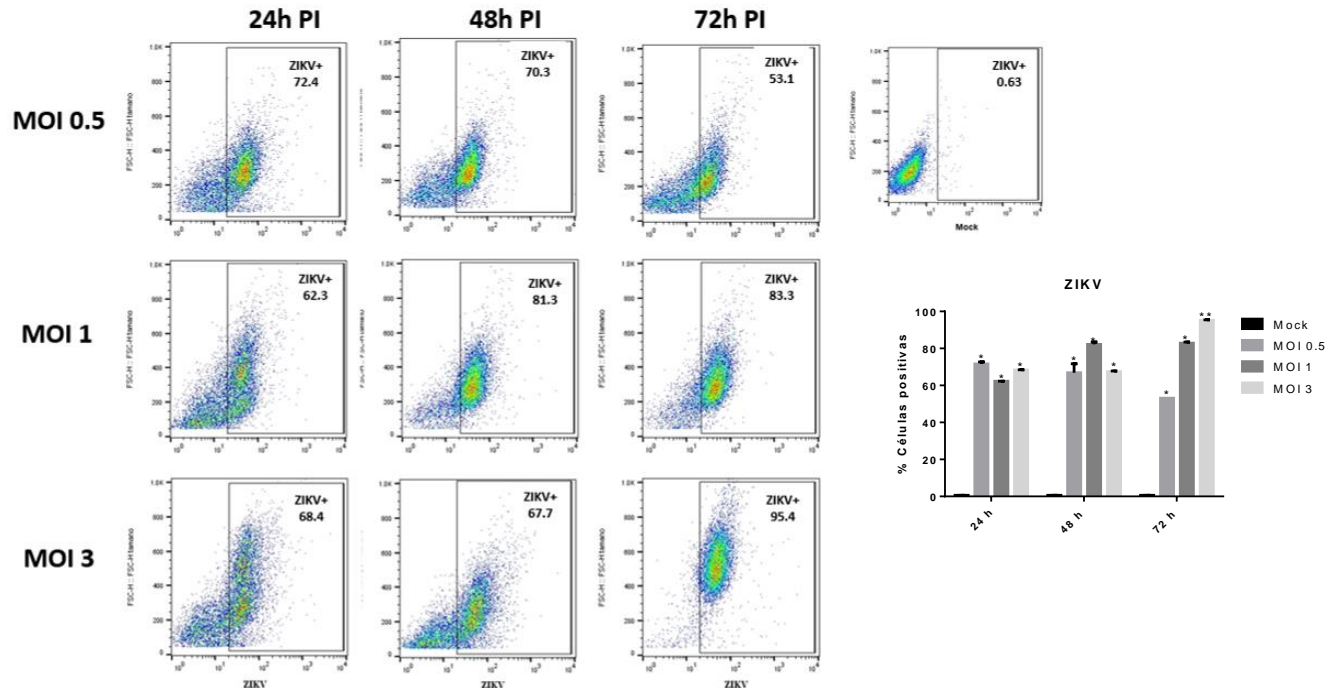


**Figura 7.** Titulación mediante ensayo de placa lítica de ZIKV (MR766). En el recuadro amarillo se muestra la última dilución en la que se observó la formación de placas líticas y los triángulos amarillos señalan las placas líticas.

## Evaluación de la infección viral en monocitos THP-1

Con el objetivo de determinar la condición óptima de infección en los monocitos, se llevó a cabo una cinética de infección por ZIKV. Se detectó la proteína de envoltura del ZIKV mediante citometría de flujo, en monocitos humanos infectados con una MOI de 0.5, 1 o 3 evaluándose a las 24, 48 o 72 hPI.

Encontramos que desde las 24 horas post-infección, hay un 60 a 80% de células positivas a la infección, es decir, monocitos en los que se detectó el antígeno viral. Este efecto se pudo observar con las tres MOI utilizadas (0.5, 1 y 3). A las 72 horas se observó desde un 50 hasta un 95% de células positivas a la infección, mostrando un efecto dependiente de la MOI utilizada, en la MOI de 0.5 se presentó alrededor de 50%; la MOI de 1 alrededor de 80%; y la MOI de 3 un 95% de positividad (**figura 8**).



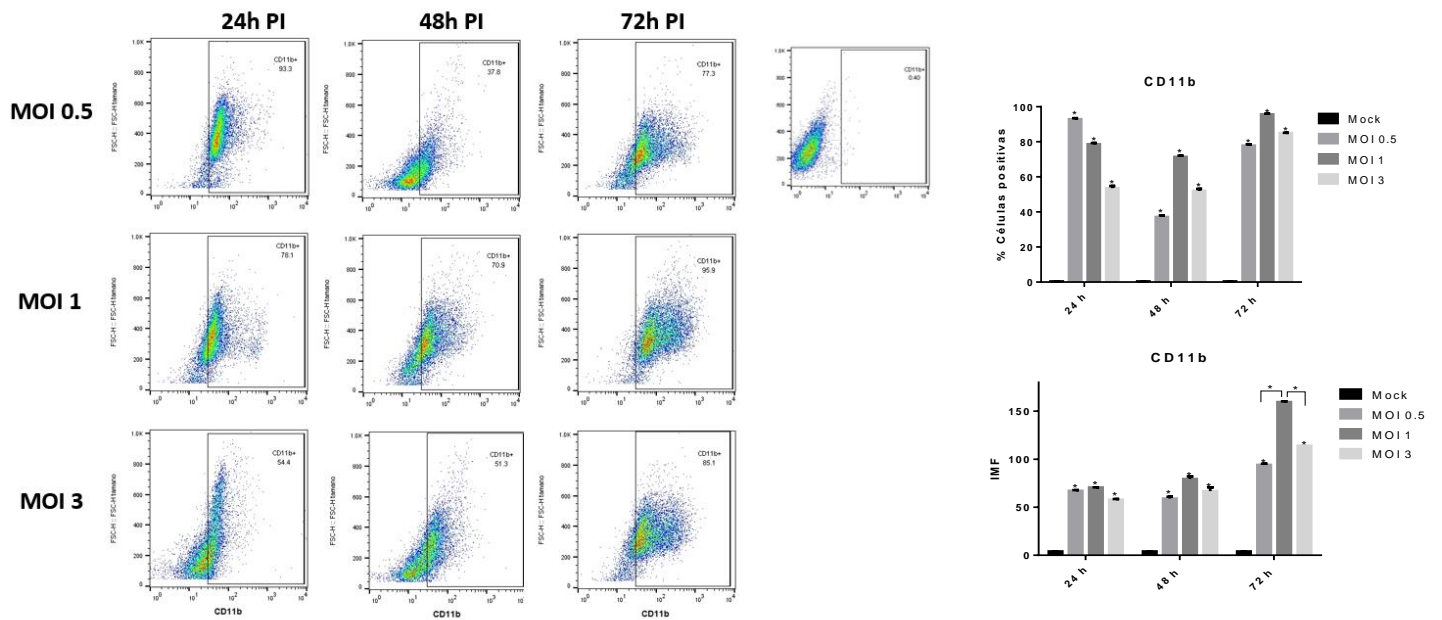
**Figura 8.** Cinética de infección de ZIKV en monocitos THP-1. Se observa el porcentaje de monocitos infectados: positivas a ZIKV (lado derecho) y negativas (lado izquierdo), en

las diferentes condiciones evaluadas. En la gráfica se muestra el porcentaje de los monocitos infectados por ZIKV.

### **Evaluación de la activación de monocitos THP-1 mediante el marcador CD11b.**

Los monocitos son uno de los principales blancos celulares del ZIKV. En condiciones de infección, éstos se diferencian y se activan, adquiriendo características que le confieren una mayor adhesión al endotelio vascular. Una de las proteínas involucradas en el proceso de adhesión es la integrina CD11b por lo cual, es usado como un marcador de activación monocitaria (Thaler y cols., 2016). En este trabajo, evaluamos la integrina CD11b como marcador de activación/diferenciación de monocitos infectados por ZIKV. Se llevó a cabo la detección de CD11b en monocitos humanos infectados con una MOI de 0.5, 1 o 3, que fueron evaluados a 24, 48 o 72 horas post-infección.

Encontramos que el porcentaje de células positivas a CD11b es inversamente proporcional a la MOI a las 24 horas post-infección, ya que con menor MOI hay una mayor presencia de la integrina y a mayor MOI una menor detección de la integrina. Sin embargo, a las 48 horas en la MOI de 0.5 se observa disminución en la detección de la integrina CD11b; a las 72 horas post-infección el porcentaje de células positivas a CD11b se mantiene entre 75 y 90%. Por otro lado, la intensidad media de fluorescencia se mantiene en niveles similares (alrededor 60) entre las 24 y 48 horas post-infección; a las 72 horas parece haber aumento en las 3 MOI, aunque con la MOI 1 parece duplicarse. En todas las condiciones el aumento es significativo, respecto a células mock, lo cual indica que hay activación celular, y que se está promoviendo la adhesión celular de monocitos infectados con ZIKV (**figura 9**).

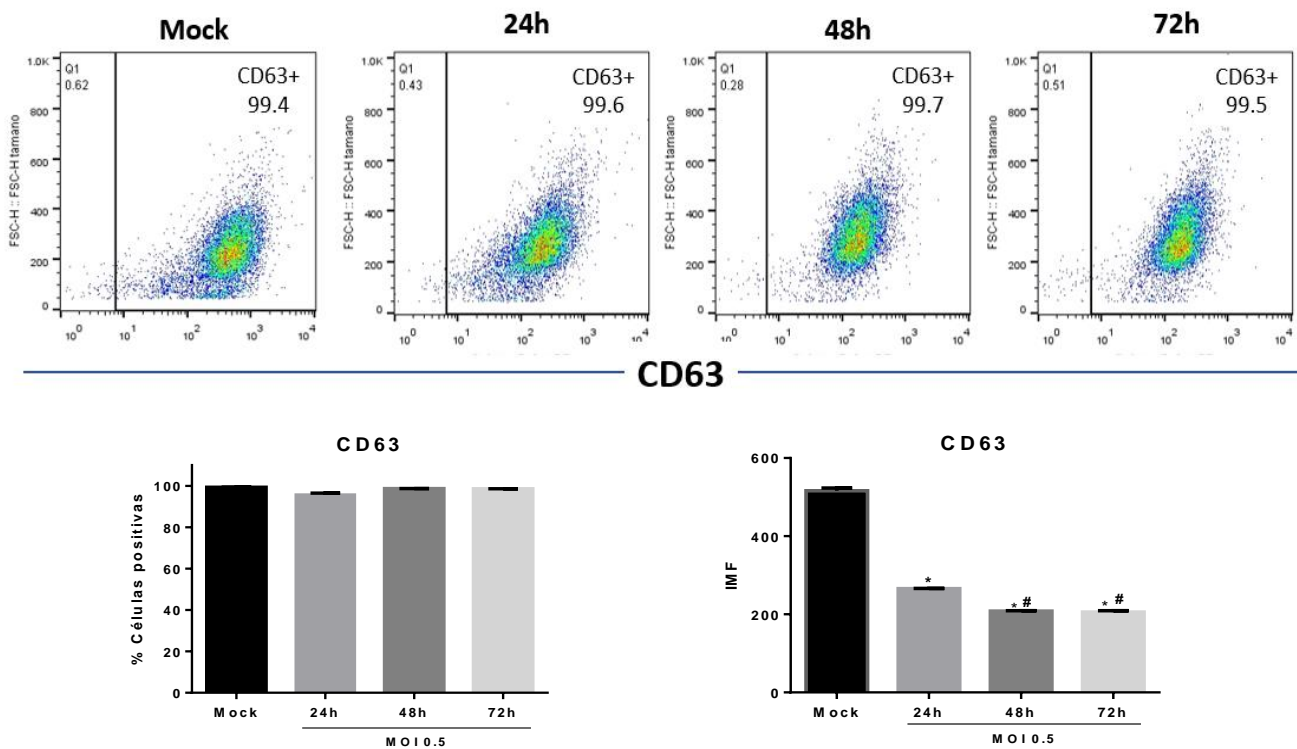


**Figura 9.** Evaluación de la activación de monocitos THP-1 mediante la detección de la integrina CD11b. Se muestra el porcentaje de células positivas a CD11b y la intensidad media de fluorescencia (IMF).

### Detección de la tetraspanina CD63 en monocitos humanos infectados por ZIKV

Como se mencionó anteriormente, los exosomas son producidos por las células en condiciones fisiológicas y patológicas, sin embargo, en condiciones patológicas su producción es mayor. Uno de los principales marcadores exosomales es la tetraspanina CD63. La tetraspanina CD63 es una proteína constitutiva que se localiza en la superficie de la membrana plasmática, la cual está involucrada en la biogénesis de los exosomas, ya que a partir de sitios ricos en tetraspaninas de la membrana plasmática, se forman endosomas tempranos que dan lugar al MVB y posteriormente a la liberación de los exosomas. Por ello, se evaluó inicialmente la presencia en la superficie membranal de la tetraspanina CD63 en monocitos infectados con ZIKV.

Se evaluó la presencia de la tetraspanina CD63 en monocitos infectados con una MOI de 0.5 a las 24, 48 o 72 horas post-infección. Como era de esperarse, se observó la presencia de la tetraspanina CD63 en las diferentes condiciones evaluadas (mock; MOI 0.5: 24, 48 o 72 horas PI) en más del 90% de las células, ya que es una proteína constitutiva. Sin embargo, durante la formación de endosomas tempranos la tetraspaninas se internalizan y disminuyen a nivel de la superficie membranal. Al observar la IMF se encontró que en las células que fueron infectadas con ZIKV se disminuía en aproximadamente un 50% la presencia de la tetraspanina desde las 24 horas, pero el valor más bajo se encuentra desde las 48 hPI con alrededor de 200 en IMF (figura 10).

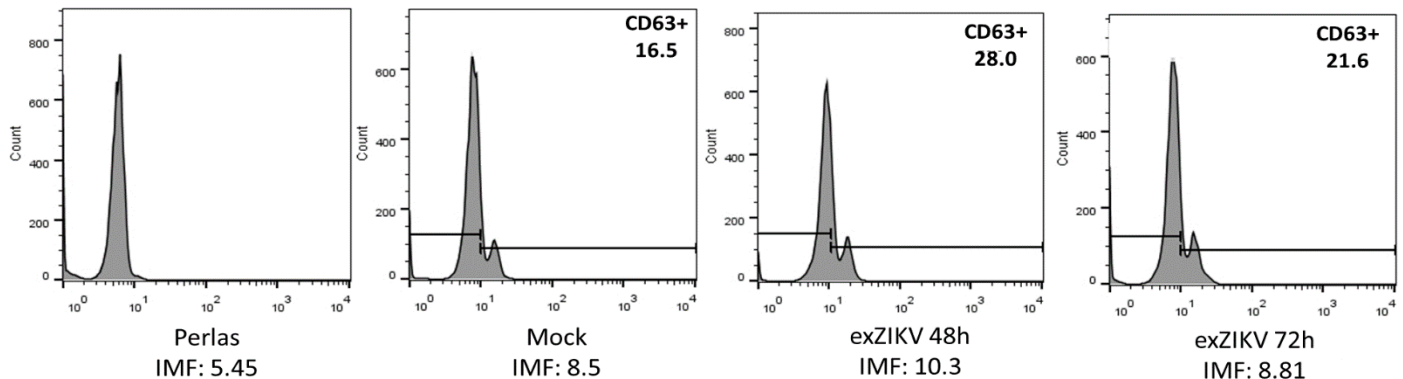


**Figura 10.** Detección de CD63 en monocitos infectados con ZIKV. Se detectó la tetraspanina CD63 (marcador exosomal) en monocitos THP-1 infectados con ZIKV. Se

muestra el porcentaje de células positivas (plot y gráfica) al marcador y la IMF (gráfica inferior).

### Aislamiento de exZIKV derivados de monocitos THP-1

Teniendo en cuenta que la detección de la tetraspanina CD63 en monocitos infectados por ZIKV sugieren su internalización (como se observa en la IMF, **figura 10**) a una MOI de 0.5 desde las 48 h PI. Se evaluó la producción de exosomas de monocitos infectados con una MOI de 0.5 a las 48 y 72 hPI. Observamos que efectivamente, hay producción de exosomas tanto en las células Mock (16.5%) como en las células infectadas, sin embargo, la detección de la tetraspanina es mayor en células con 48 horas de infección (28%), incluso, en comparación con las células infectadas 72 horas (21.6%). Lo anterior de reflejó tanto en el porcentaje de perlas magnéticas detectadas, así como en la IMF. Debido a ello, se concluyó que la condición óptima para el aislamiento de exosomas es a las 48 h PI con una MOI de 0.5 (**figura 11**).



**Figura 11.** Detección de exZIKV mediante citometría de flujo. Se observan las condiciones evaluadas: perlas (para evaluar marcaje inespecífico), exosomas derivados de células Mock, exZIKV 48 horas PI, exZIKV 72 horas PI.

## **Estandarización de las condiciones del modelo de permeabilidad de BHE *in vivo***

El ZIKV es un virus neurotrópico en el SNC, para lo cual debe atravesar la BHE. Sin embargo, poco se ha estudiado su efecto en el SNC en modelo murino. Por ello, se evaluó la permeabilidad de la BHE en ratones infectados por ZIKV.

Se infectaron ratones macho BALB/c con  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  UFP (diluido en 200  $\mu$ l de PBS estéril), y transcurridas 24, 48 o 72 horas se llevaron a cabo ensayos de permeabilidad de BHE a Na-F y azul de Evans.

En la **figura 12** se encuentran las gráficas que muestran la concentración de trazadores en mg/gr de tejido, de Na-F (370 Da) a la izquierda y de azul de Evans (70 kDa) a la derecha. Se observa que las regiones cerebrales presentan una permeabilidad diferente respecto a la otra, siendo corteza y cerebelo las regiones más permeables. También observamos que la condición en la que la permeabilidad presenta un mayor aumento es a las 48 horas PI con  $1 \times 10^5$  UFP. Cabe mencionar, que la permeabilidad también es diferente para cada trazador ya que para azul de Evans es mayor que para Na-F. Esto nos indica que la BHE es selectiva a cada molécula y que, en este caso, el transporte para el Na-F parece estar más regulado.

Debido a que las condiciones que presentan un efecto claro de aumento de la permeabilidad de la BHE fueron a las 48 horas post-infección con una dosis de  $10^5$  UFP, se determinó que esas son las condiciones óptimas de infección para los siguientes experimentos.

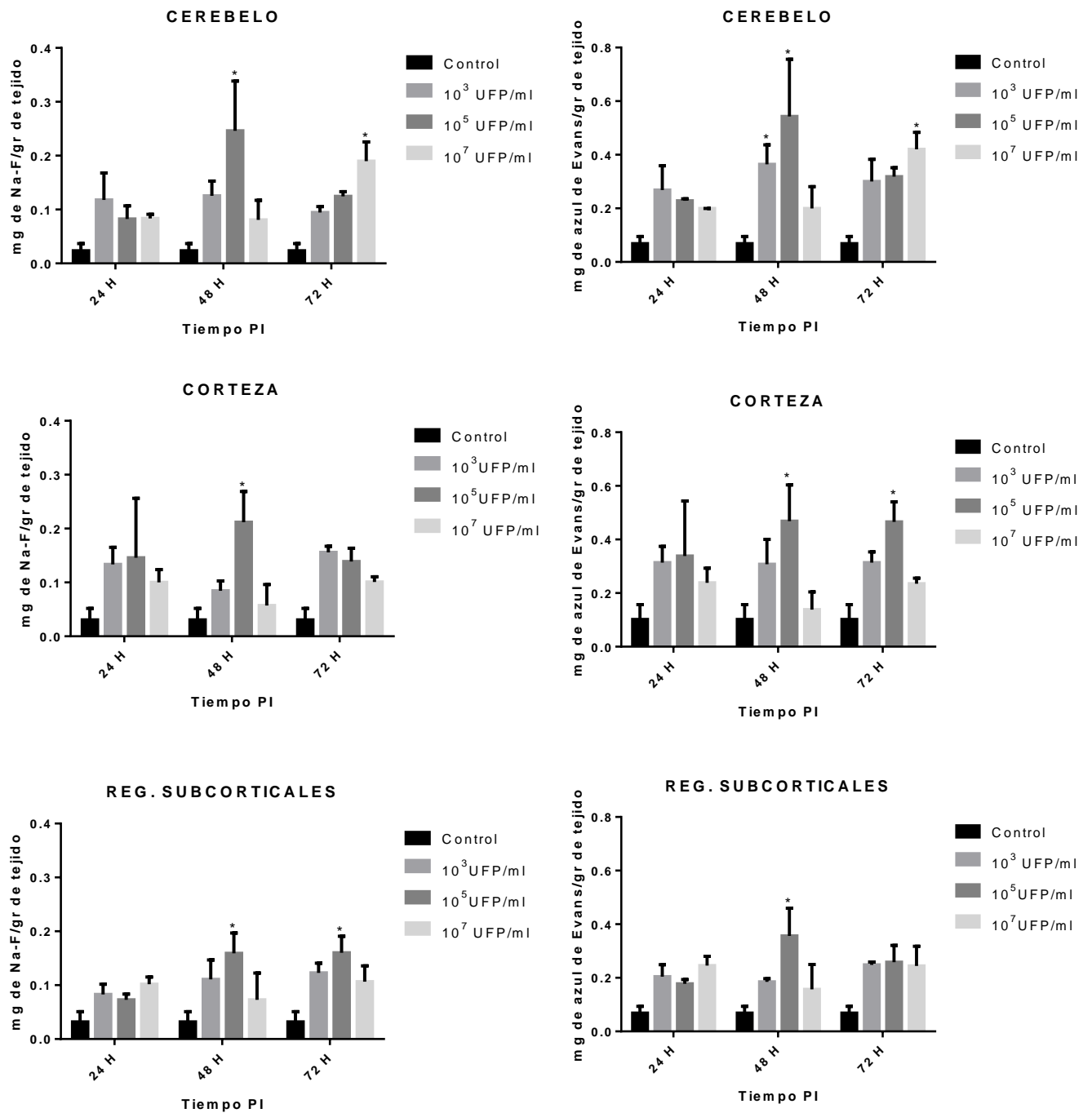


### **Evaluación de la permeabilidad de la BHE en ratones estimulados con exZIKV**

Se ha descrito que exosomas de células periféricas pueden modificar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a nivel de SNC (Li y cols, 2018). En el presente trabajo, se evaluó la permeabilidad de la BHE en ratones estimulados con exZIKV. Para determinar si los exZIKV están asociados al cambio en la permeabilidad de la BHE en ratones, se administraron 50 y 25µg de proteína de exZIKV y se evaluó la permeabilidad a los trazadores Na-F y azul de Evans, 48 o 72 horas después de la administración de exZIKV.

Se observó que hay aumento de la permeabilidad a Na-F desde las 48 horas post-administración de 25µg de exZIKV en corteza y regiones subcorticales; y a las 72 horas con 50µg de exZIKV en las tres regiones evaluadas. La permeabilidad a azul de Evans aumenta a las 48 horas con 25µg de exZIKV en cerebelo y corteza; mientras que a las 72 con 50µg aumenta en las tres regiones evaluadas **(figura 13)**.

Estos datos nos indican que los exZIKV si inducen cambio en la permeabilidad, y que este cambio depende del trazador y de la región cerebral que se evalúe. En este caso encontramos que la permeabilidad es mayor para azul de Evans, y que la corteza es la región más permeable.

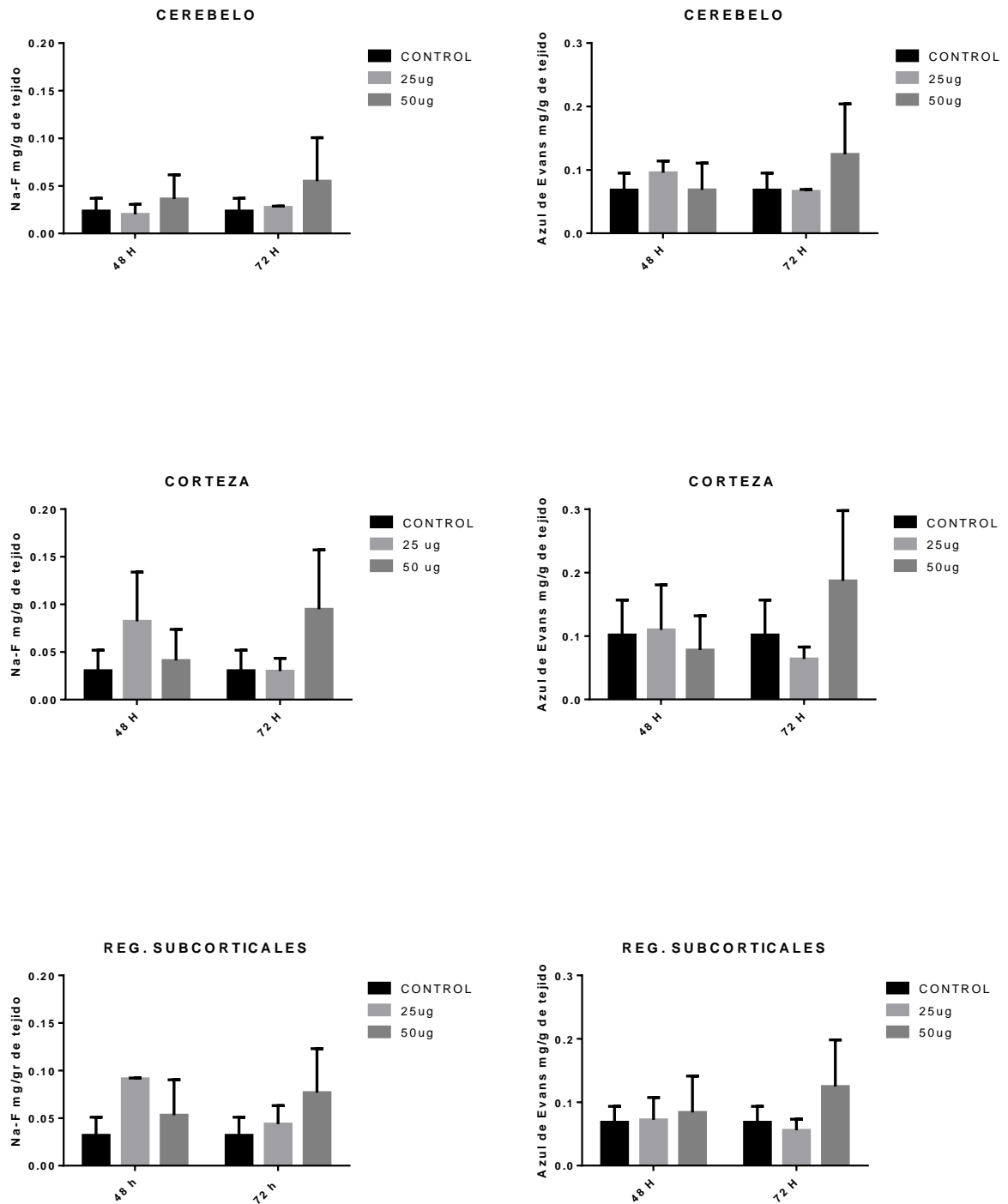


**Figura 12.** Aumento en la permeabilidad de BHE en ratones infectados con ZIKV. Se muestra la concentración de trazadores Na-F (izquierda) y azul de Evans (derecha) en mg/gr de tejido cerebral en cerebelo, corteza y regiones subcorticales de ratones infectados con 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> o 10<sup>7</sup> UFP, que fueron evaluados a 24, 48 o 72 h PI. \*p<0.05.

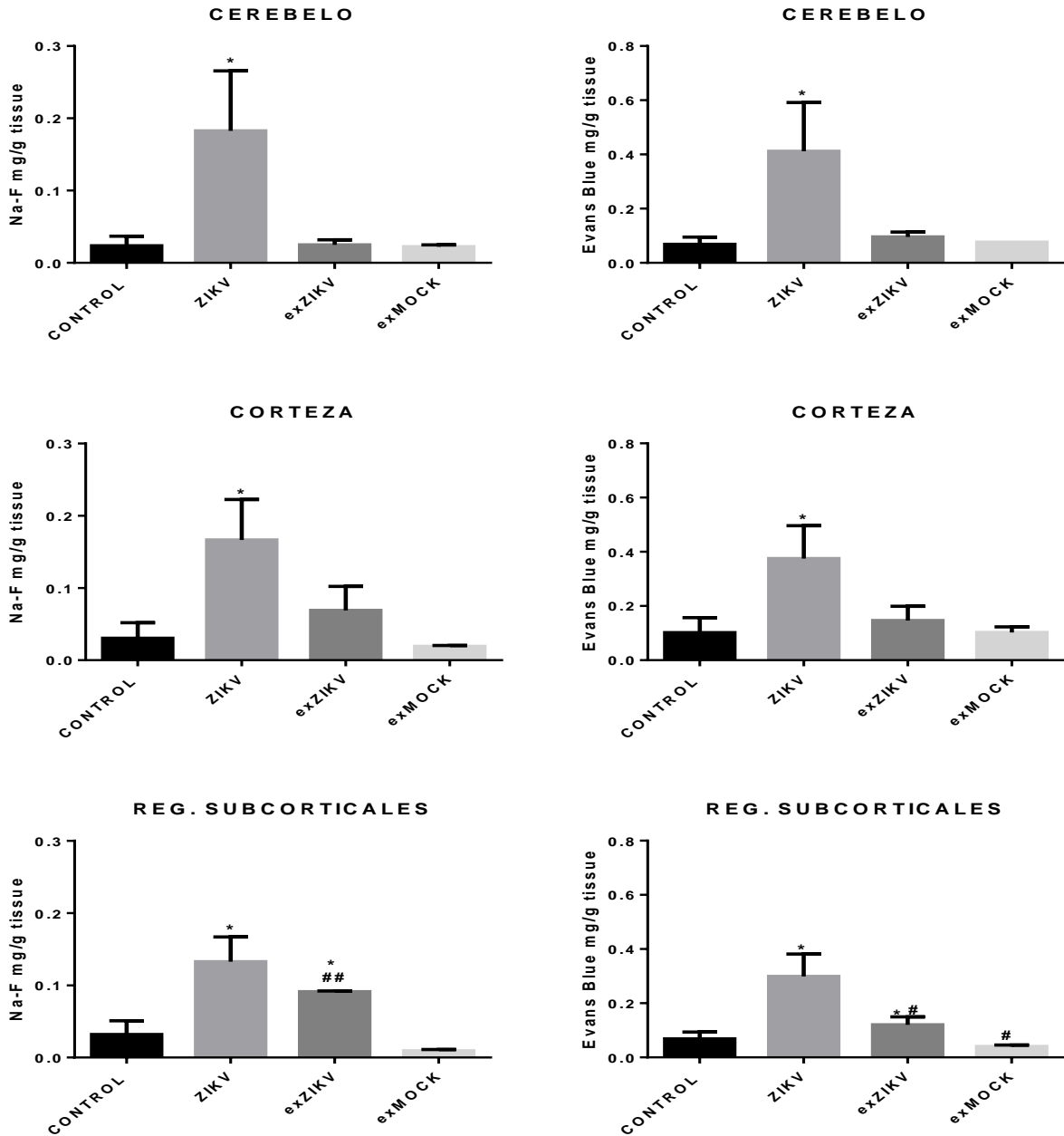
## **Los cambios en la función de la barrera hematoencefálica dependen de la exposición a exosomas provenientes de monocitos infectados**

Las vesículas extracelulares son vesículas liberadas por las células en condiciones fisiológicas y patológicas que son importantes en la intercomunicación celular. Por ello fue importante evaluar si los exosomas de monocitos no infectados (exMock) tenían algún efecto sobre la permeabilidad de la BHE en los ratones. Además, debido a que los exosomas fueron suspendidos en PBS 1X, este ensayo nos permite ver el efecto del vehículo, confirmando que el vehículo no está aumentando la permeabilidad de la BHE de los ratones. Debido a esto, se utilizó un grupo de ratones a los cuales se les inocularon 25µg de proteína de la suspensión de exMock y 48 horas después se llevaron a cabo ensayos de permeabilidad de la BHE con los trazadores anteriormente utilizados.

Se observó que los ratones que fueron inoculados con exMock no mostraron aumento en la permeabilidad de la BHE de los ratones (**figura 14**), ya que la concentración de trazadores cuantificada en el tejido cerebral evaluado se mantiene similar a los niveles de los controles. Esto nos sugiere que el efecto puede estar dado por los componentes virales que pudieran ser transportados en los exZIKV o por moléculas producto de la activación de los monocitos infectados por ZIKV, como citocinas proinflamatorias.



**Figura 13.** Aumento de la permeabilidad de la BHE en ratones estimulados a diferentes concentraciones de exZIKV. Del lado izquierdo se encuentran las gráficas correspondientes al trazador Na-F y del lado derecho azul de Evans.

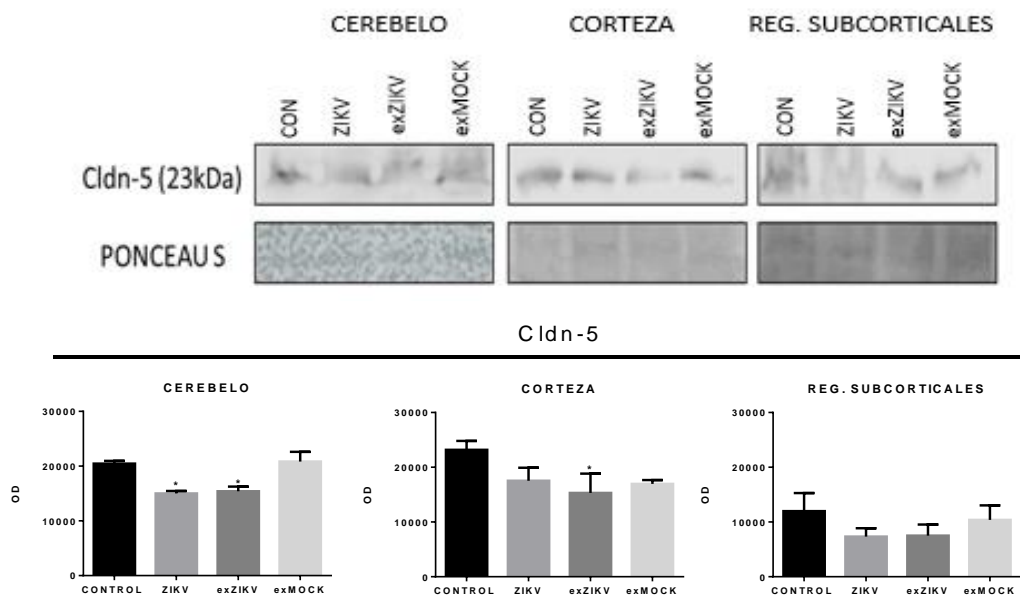


**Figura 14.** Evaluación de la permeabilidad de la BHE en modelo *in vivo* infectado con ZIKV o tratado con exosomas derivados de monocitos. Se presenta la concentración (mg/ml) de Na-F (izquierda) y a azul de Evans (derecha), en tres diferentes regiones cerebrales: cerebelo, corteza y regiones subcorticales ( $p < 0.1$  \*, #;  $p < 0.05$  ##, \* comparado contra control; # comparado contra ZIKV).

## Los exZIKV promueven disminución de la proteína de uniones estrechas, cldn-5, en el modelo *in vivo*

La BHE es altamente selectiva y por lo tanto mantiene una baja permeabilidad en comparación con el endotelio de otros tejidos. En parte, esta característica es debido a la alta presencia de cldn-5, proteína que forma parte de las uniones estrechas u ocluyentes, regulando el flujo paracelular.

Debido a lo anterior se evaluó el contenido proteico de cldn-5 mediante western blot. Se observó que el contenido proteico de cldn-5 disminuye en condiciones de infección y también en los ratones que fueron estimulados con los exZIKV, en comparación con el control. Este efecto se observa prácticamente en las tres regiones evaluadas. Los ratones que fueron estimulados con exMock no parecen presentar este efecto, lo cual concuerda con los datos de permeabilidad, ya que los ratones que fueron estimulados con exMock, tampoco presentaban aumento en la permeabilidad de la BHE (**figura 15**).



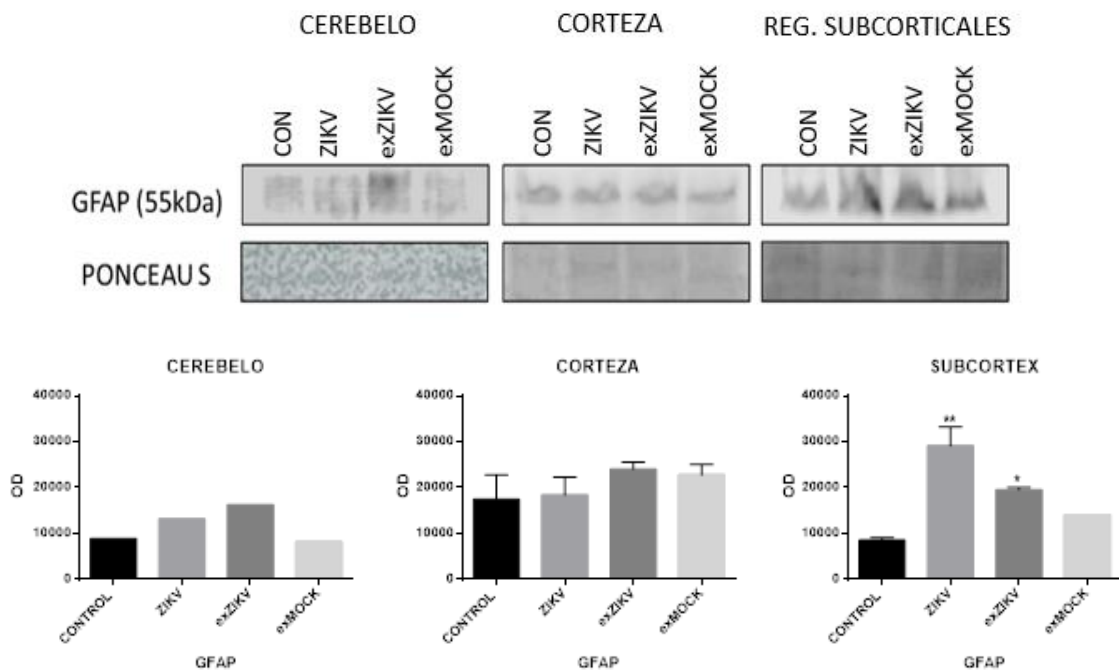
**Figura 15.** La proteína Cldn-5 disminuye en endotelio cerebral de ratones infectados con ZIKV o estimulados con exZIKV. En el panel superior se muestra el western blot y en la parte inferior la densitometría de Cldn-5 en cerebelo, corteza y regiones subcorticales en las diferentes condiciones evaluadas: control, infectados con ZIKV, estimulados con exZIKV o estimulados con exMock.

### **Evaluación de neuroinflamación en ratones estimulados con exZIKV.**

En este trabajo se evaluó la activación astrogliar mediante la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), la cual aumenta en condiciones neuroinflamatorias. Encontramos que hubo una mayor concentración de la proteína GFAP en el tejido cerebral de ratones infectados con ZIKV y también en los estimulados con exZIKV, en comparación con el control. Esto se observó principalmente en regiones subcorticales, en donde se observa que el nivel de la proteína se duplica en el caso de los ratones estimulados con exZIKV o se triplica en el caso de ZIKV, respecto al control. Esto nos indica que se está presentando astrogliosis en esta región. En el caso de los ratones que fueron inoculados con exMock, parece no haber cambios en cerebelo y corteza, pero sí un ligero aumento en regiones subcorticales, en comparación con el control (**figura 16**).

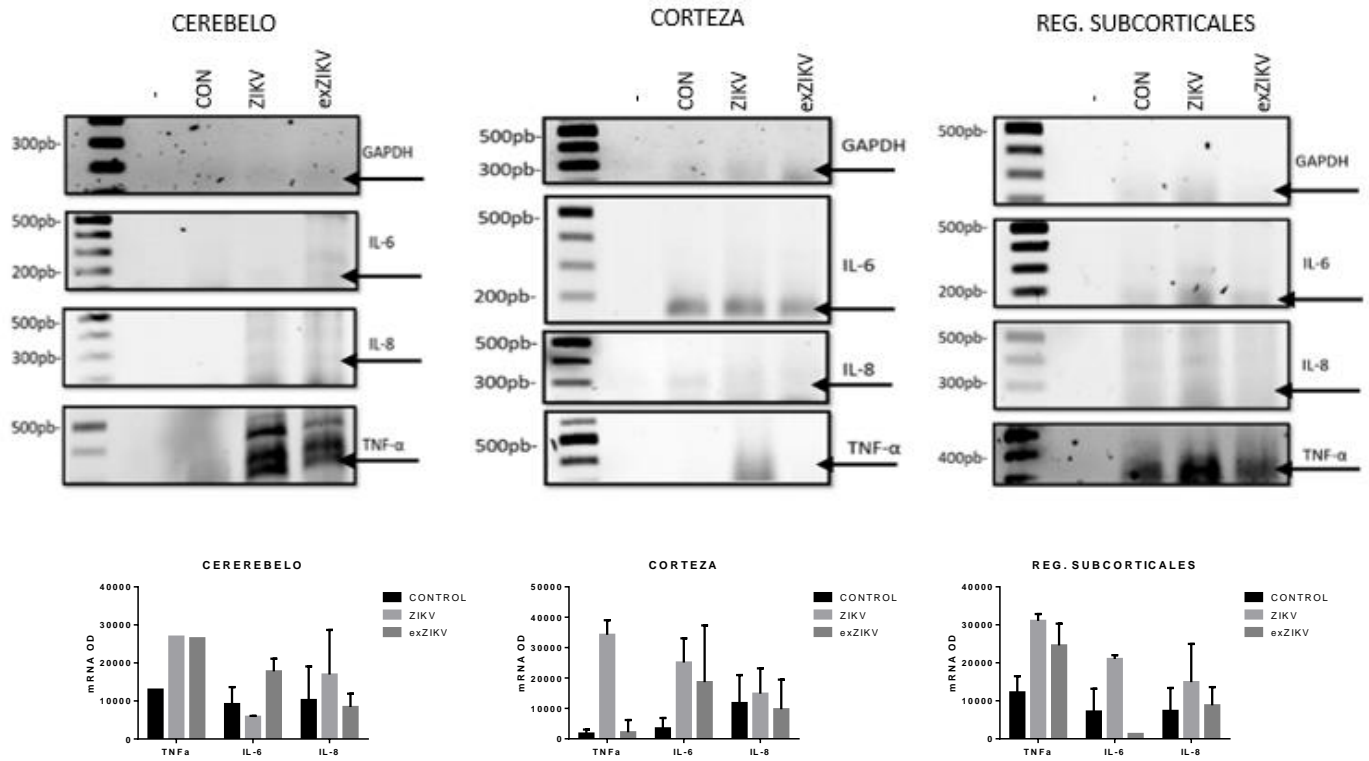
Por otro lado, se evaluó la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en los cerebros de los ratones controles, infectados con ZIKV y estimulados con exZIKV, evaluando de igual forma cerebelo, corteza y regiones subcorticales. Lo que se observó fue que la expresión del mRNA se presenta de forma diferencial entre una región y otra. En el caso del cerebelo se detectó una mayor expresión del mRNA de las 3 citocinas

evaluadas en el tejido cerebral de los ratones estimulados con exZIKV; mientras que, en los infectados con ZIKV se detectó IL-8 y TNF- $\alpha$ . En corteza cerebral hay una mayor expresión de TNF- $\alpha$  en los cerebros de ratones estimulados con ZIKV en comparación con el grupo control; aunque no se observan cambios en la expresión de IL-6 e IL-8. Por otra parte, en regiones subcorticales hay aumento tanto en TNF- $\alpha$  como en IL-8 en los animales infectados con ZIKV (**figura 17**). Se observa que en las tres regiones hay aumento en TNF- $\alpha$  en los ratones infectados por ZIKV, y que los exZIKV inducen su expresión en cerebelo y regiones subcorticales.



**Figura 16.** Evaluación de astrogliá reactiva mediante la detección de GFAP. Se muestran el western blot (panel superior) y la densitometría (panel inferior) de la proteína GFAP en cerebelo, corteza y regiones subcorticales de ratones controles, infectados con ZIKV, estimulados con exZIKV o con exMock.





**Figura 17.** Evaluación de neuroinflamación. Expresión del mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 y GAPDH en cerebelo (A), corteza (B) y regiones subcorticales. Las condiciones evaluadas son las siguientes: control negativo de mRNA, control, infectados con ZIKV o estimulados con exZIKV.

## 11. DISCUSIÓN

El zika es una enfermedad causada por el ZIKV, el cual ha mostrado afectar el SNC. Su principal célula diana son los monocitos (Jurado e Iwasaki, 2017). En el caso de los monocitos al presentarse estímulos adversos, por ejemplo, durante la infección viral, éstos se activan y pueden responder generando citocinas proinflamatorias y, actualmente también se ha descrito que hay producción de vesículas extracelulares como micropartículas y exosomas (Anderson y cols., 2016; Schorey y cols., 2015). En este trabajo se mostró que los exZIKV pueden promover aumento de la permeabilidad de la BHE en ratones, además de la disminución de cldn-5, proteína de unión ocluyente y aumento en marcadores inflamatorios como GFAP indicador de astrogliosis; TNF- $\alpha$  e IL-6. Se observó que estos datos son dependientes de la región cerebral evaluada.

Se ha descrito que los monocitos infectados por ZIKV promueven la adhesión celular y su trans migración a través de la BHE (Ayala-Nunez y cols., 2019; de Carvalho y cols., 2019). Sin embargo, no se ha estudiado el papel de las vesículas extracelulares que se derivan de los monocitos infectados por ZIKV, ni su efecto a nivel del sistema nervioso central, ya que se ha reportado que en casos severos de zika se presenta encefalitis y daño al SNC. En el presente trabajo evaluamos en un modelo in vivo el efecto de los exosomas en el SNC de monocitos humanos infectados por ZIKV (exZIKV).

El principal blanco celular del ZIKV son los monocitos, específicamente CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (Milchmayr y cols., 2017). Debido a ello, en este trabajo utilizamos este tipo celular y encontramos que efectivamente, los monocitos son susceptibles a la infección por ZIKV. La condición que se eligió para la obtención de exosomas fue en monocitos infectados

con una MOI de 0.5 a las 48 horas. En esta condición a pesar de ser la menor MOI evaluada, se detectó el antígeno viral en aproximadamente el 70% de los monocitos.

Los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, que representan los monocitos intermedios, se han encontrado presentes en microambientes pro-inflamatorios y se ha visto que presentan mayores niveles de la integrina CD11b (Thaler y cols. 2016). Se ha descrito que durante el proceso inflamatorio aumentan los niveles de moléculas de adhesión celular que promueven la adhesión de los monocitos al endotelio vascular, facilitando la infiltración hacia los tejidos (Patarroyo M, 1994), lo cual también es indicador de activación celular. Así mismo, se ha descrito que la integrina CD11b puede estar asociada a la diferenciación en macrófagos (Jakubzick y cols., 2017).

Es por ello por lo que, esta integrina se utilizó como marcador de activación. En este trabajo, se observó que los monocitos infectados con ZIKV presentan mayores niveles de la integrina CD11b<sup>+</sup> desde las 24 post-infección, incluso con la MOI de 0.5, indicativo de que con esa condición ya hay activación celular. Por otro lado, teniendo en cuenta que la gráfica (plot) se encuentra el tamaño vs fluorescencia (**figura 9**), se observa que las células aumentan su tamaño, principalmente en las células infectadas con una MOI 3 a las 72 h. Estos datos nos sugieren que las células podrían estarse diferenciando, sin embargo, para asegurarlo se requiere de marcadores de superficie específicos.

Tang y cols., (2016) describieron que en los monocitos activados se induce una mayor producción de exosomas. Se encontró que los niveles de la integrina CD11b se encuentran aumentados en la superficie celular de los monocitos infectados con ZIKV en comparación con las células mock, lo que sugiere que se están produciendo exosomas en los monocitos infectados.

Uno de los marcadores exosomales principalmente utilizados es la tetraspanina CD63 (Thery y cols., 2018), Esta tetraspanina es una proteína que se encuentra de forma constitutiva en la membrana plasmática de la célula (Pols & Klumperman, 2009). En este trabajo se evaluó la presencia de CD63 en monocitos infectados por ZIKV (**figura 10**). Encontramos que en todas las condiciones hay más del 95% de células positivas a la tetraspanina, lo cual es de esperarse ya que como se mencionó antes, es una proteína que se presenta de forma basal en las células. Mediante la IMF, se observó que los niveles de la tetraspanina disminuyen en la superficie celular hasta en un 70% desde las 48 horas. Esta disminución de la tetraspanina en la superficie celular, puede estar sucediendo debido a su internalización para dar lugar a la formación del endosoma temprano, y posteriormente a las ILVs (Pols & Klumperman, 2009), por lo que, estos datos sugieren que el momento adecuado para obtención de EVs podría ser entre las 48 y 72 horas. La tetraspanina CD63 está involucrada en la biogénesis tanto dependiente como independientemente del complejo ESCRT, por lo cual, la tetraspanina CD63 es uno de los principales marcadores exosomales (Andreu y Yañez, 2014; Van Niel y cols., 2012).

Las EVs se producen en las células de forma fisiológica, sin embargo, en condiciones patológicas o en un ambiente proinflamatorio la producción de EVs aumenta (Tang y col., 2016). En el contexto de la infección por ZIKV, se corroboró lo que se describe en la literatura, ya que, los monocitos que fueron infectados por ZIKV presentaron una mayor cantidad de exosomas que el grupo mock a las 48 h. Además, este dato podría confirmar que la disminución de la tetraspanina CD63 de la membrana plasmática podría deberse

precisamente, a su internalización para la formación de las ILVs, y la consecuente formación de los exosomas.

Como se mencionó antes, los exosomas pueden llevar diferentes moléculas cargo y se les ha atribuido un papel importante durante el proceso de infección por virus, debido a la convergencia durante la biogénesis de los exosomas con la biogénesis viral (Schorey y cols., 2015). Asimismo, se ha descrito su participación como mediadores de neuroinflamación (Li JJ y cols., 2018). En el caso de la infección por ZIKV no se había descrito el efecto que los exosomas de células infectadas pudiesen tener en el SNC. Teniendo en cuenta que el ZIKV es un virus neurotrópico, se evaluó el efecto de estas vesículas a nivel del sistema nervioso central en un modelo *in vivo*.

Uno de los efectos de los exZIKV en el SNC puede presentarse a nivel de BHE. Se observó que la permeabilidad de la BHE se incrementó hasta 4 veces en comparación con el control. Estos datos son contrarios con lo reportado en por Mladinich y cols., (2017) ya que describieron la infección por ZIKV en un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro* en el cual, muestran que las células endoteliales de la línea celular hBMECs son susceptibles a la infección por el ZIKV y que su diseminación es de forma basolateral. También muestran que la infección por ZIKV no modifica la TEER ni la permeabilidad de la monocapa endotelial, por lo que concluyen, que no hay alteración de la BHE durante la infección por ZIKV. Sin embargo, no se puede decir que utilizan un modelo de BHE, ya que para que las células endoteliales adquieran un fenotipo de BHE requieren de moléculas secretadas por astrocitos, pericitos, entre otras células del SCN. Se ha comparado la resistencia eléctrica trans-endotelial (TEER) (que está directamente relacionada con la permeabilidad) en un sistema *in vitro* e *in vivo* (1500-6000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ),

observando que la TEER del sistema *in vitro* ( $<500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) es menor, lo cual indica en principio una mayor permeabilidad. A pesar de que actualmente han mejorado mucho los modelos *in vitro* propuestos y la TEER ha aumentado conforme mejora el sistema (Mantle y cols., 2016). Se ha descrito que el ZIKV también puede infectar células gliales como los astrocitos y la microglía (Meertens y cols., 2017) y éstas responden mediante la generación de citocinas proinflamatorias que pueden contribuir al aumento de permeabilidad de la BHE (Hurtado-Alvarado y cols., 2017; Li y cols., 2015). Por lo tanto, esta podría ser uno de los mecanismos mediante el cual el ZIKV promueve aumento en la permeabilidad de la BHE, es decir, una forma indirecta mediada por la activación de células gliales.

Recientemente se ha observado que las vesículas extracelulares pueden ser vehículos de transporte de biomoléculas en algunas condiciones patológicas como asma, cáncer, enfermedades neurodegenerativas e infecciones virales (Daßler-Plenker y cols., 2020; Gupta y Pulliam, 2014). En el caso de *Flavivirus* se ha descrito (en modelos *in vitro*) que los exosomas derivados de células infectadas con el virus Langkat (modelo utilizado para el estudio del TBEV) pueden contener partículas infectivas, además de infectar y estimular diferentes células como el endotelio cerebral, proponiendo que pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Zhou y cols., 2018). En nuestro estudio, se evidenció que efectivamente, los exZIKV pueden inducir un aumento en la permeabilidad de la BHE en corteza y regiones subcorticales, sin embargo, no se observa en cerebelo. El aumento en la permeabilidad de la BHE en ratones estimulados con exZIKV es menor al encontrado en ratones infectados con ZIKV. En el caso de los exosomas provenientes de monocitos no infectados (exMock) no se observó un incremento de la permeabilidad

de la BHE, manteniéndose en valores similares a los del control. Este último dato nos indica en primer lugar que los cambios en la permeabilidad de la BHE están favorecidos por exosomas generados por la activación de los monocitos infectados, y no por el exosoma *per se*. También nos indica que el vehículo en el que fueron suspendidos los exosomas (PBS 1X) no está promoviendo aumento en la permeabilidad. Se sabe que los exosomas podrían contener diferentes moléculas como citocinas y ser mediadores neuroinflamatorios (Gupta y Pulliam.2014; Sterzenbach y cols., 2017). Los exZIKV podrían contener algunas moléculas que promovieran neuroinflamación y, por consiguiente, favorecer un aumento en la permeabilidad de la BHE.

En el contexto de la permeabilidad de la BHE, se sabe que existen diferentes vías de transporte, tanto paracelulares como transcelulares (Villaseñor y cols., 2019). En el estudio de la estructura y función de la BHE, se debe tener presente la presencia de las uniones intercelulares, sobre todo en *cldn-5*, que forma parte de las uniones estrechas u ocluyentes y que es considerada la principal reguladora del paso paracelular, es decir, entre una célula endotelial y otra (Ohtzuki y cols., 2008).

La proteína *cldn-5* es un regulador maestro en la permeabilidad de la BHE, ya que ensayos con ratones knockout para la proteína claudina resulta en ratones no viables, es decir, éstos no sobreviven; en cambio, el knockout de ocludina, otra de las proteínas que también forma parte de las uniones ocluyentes, sí es viable (Nitta y cols., 2003).

Debido a la importancia de *cldn-5*, en este estudio se evaluaron los cambios en los niveles de esta proteína en tejido cerebral de los ratones infectados por ZIKV, estimulados con exZIKV o con exMock. Se observó que hay una disminución en el contenido proteico de *cldn-5* en los infectados con ZIKV, así como en los estimulados

con exZIKV. Lo cual nos sugiere que este podría ser el mecanismo por el cual se presenta aumento de la permeabilidad de la BHE. En condiciones inflamatorias se ha observado cldn-5 puede verse disminuida favoreciendo el aumento de la permeabilidad (Aslam y cols., 2012; Hurtado-Alvarado y cols., 2017; Li F y cols., 2015). Los resultados indican que hay disminución en el nivel de proteína de cldn-5, mostrando significancia en cerebelo. Se ha descrito que cldn-5 puede cambiar su localización, pasando de estar en la membrana plasmática formando uniones celulares, a estar localizada en el citoplasma, como lo describe Tornabene y cols., (2019). Al cuantificar y detectar la proteína, es posible que esté presente, sin embargo, podría no estar cumpliendo con su función completamente, si su localización cambia.

Como se mencionó anteriormente, un evento que se presenta concomitantemente con el incremento en la permeabilidad de BHE es la activación glial, es decir, tanto microglía como astrogliá se activan, conduciendo al estado neuroinflamatorio y, consecuentemente el aumento de la permeabilidad. Teniendo como antecedente la activación de las células gliales, evaluamos astrogliosis mediante la detección de GFAP en los cerebros de ratones controles, ratones infectados con ZIKV y estimulados con exZIKV. Observamos que en ratones infectados con ZIKV, así como en ratones estimulados con exZIKV, aumentaba la presencia de este marcador de activación glial en cerebelo y regiones subcorticales, mientras que en corteza no se observan cambios. Estos resultados nos indican que se está generando un proceso neuroinflamatorio, ya que la activación astrogliá está relacionada con neuroinflamación, como ya se demostró en ratones infectados por *Flavivirus* (Li F y cols., 2015) y en ratones estimulados con exosomas de ratones estimulados con LPS (Li JJ y cols., 2018).



Teniendo en cuenta el trabajo in vitro de Mladinich y cols., (2017) que concluye que las células endoteliales son susceptibles a la infección, sin cambiar su permeabilidad (mencionado anteriormente), es posible que en el modelo in vivo, este aumento en la permeabilidad de la BHE observado con la infección por ZIKV se deba a la activación glial, ya que esta activación de las células gliales (astrocitos y pericitos) podrían estar promoviendo un estado proinflamatorio que conduzca a la alteración de la BHE.

Para evaluar el proceso neuroinflamatorio, se midió la expresión de algunas citocinas proinflamatorias en cerebros (cerebelo, corteza, reg. subcorticales) de ratones estimulados con exZIKV, ZIKV y no estimulados. Se observó que hay aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  y también de IL-8. Se ha descrito que TNF- $\alpha$  así como TGF- $\beta$ 1 pueden regular la expresión de Cldn-5. En el caso de TNF- $\alpha$  mediante la activación de NF- $\kappa$ B, el cual reduce la actividad del promotor de Cldn-5, y por lo tanto el nivel proteico también disminuye, resultando en aumento en la permeabilidad (Aslam y cols., 2012). Martinez-Rojas y cols. (2020) describieron que exosomas derivados de células infectadas por ZIKV pueden promover la expresión de TNF- $\alpha$  en monocitos y células endoteliales naïve. Por otro lado, la inflamación sistémica también podría estar implicada en la irrupción de la integridad de la BHE, ya que, por ejemplo, TNF- $\alpha$  puede atravesar la BHE y de esta forma podría estar regulando la permeabilidad (Varatharaj y Galea, 2017). Por lo tanto, se podría sugerir que una de las formas por la cual disminuye el contenido proteico de cldn-5 es por la vía de TNF- $\alpha$ , mediante la activación de las células gliales, similar a lo descrito por Martinez-Rojas y cols. (2020).

Dalvi P y cols., (2017) describió que los exosomas derivados de monocitos estimulados con LPS activan a las células endoteliales, promoviendo aumento en las citocinas CCL2,

IL-1 $\beta$ , IL-6, así como en las moléculas de adhesión ICAM1 y VCAM1. Durante la infección por ZIKV, hay activación de los monocitos, los cuales aumentan la producción de exZIKV; éstos podrían estar activando la microvasculatura cerebral y de este modo, promover la neuroinflamación, y con ello el aumento en la permeabilidad de la BHE.

En su estudio con el JEV, Li F y cols., (2015) concluyeron que la neuroinflamación precede al aumento de la permeabilidad. Sin embargo, pocos han hecho seguimiento a través del tiempo evaluando permeabilidad de BHE y neuroinflamación. En este trabajo describimos que hay neuroinflamación porque detectamos GFAP y el mRNA de algunas citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 Y TNF- $\alpha$ ) en cerebros de ratones estimulados con ZIKV y exZIKV, pero desconocemos si el proceso inflamatorio precede o no al cambio en la permeabilidad. Para ello se requiere detectar las interleucinas y hacer un seguimiento a través del tiempo.

## 12. CONCLUSIÓN

Vesículas extracelulares, como los exosomas, tienen una gran importancia en la comunicación intercelular. En el contexto de la infección viral, como en el caso de los flavivirus, pueden contribuir al establecimiento del proceso infeccioso, la diseminación del virus o incluso a promover inflamación.

En el presente trabajo se observó que durante la infección por ZIKV, el monocito aumenta la producción de exosomas, incluso con bajas concentraciones de ZIKV y en un tiempo relativamente corto (48 horas).

Por otro lado, en el modelo *in vivo* encontramos que los exZIKV promueven un aumento en la permeabilidad de la BHE, aunque en menor grado que el ZIKV. El incremento en la permeabilidad de la BHE podría deberse al aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias estimuladas por exosomas de células diana infectadas con ZIKV. Sin embargo, tanto los cambios en la permeabilidad como la expresión de moléculas proinflamatorias se presentan de forma diferencial entre una región y otra, lo cual podría sugerir diferentes mecanismos del proceso en cada región cerebral.

La expresión de citocinas proinflamatorias y así como la detección de GFAP, ambos indicadores de neuroinflamación, indican que los exosomas derivados de monocitos infectados con ZIKV podrían estar favoreciendo el proceso neuroinflamatorio, así como los cambios en la permeabilidad de la BHE.

### 13. REFERENCIAS

Acosta-Ampudia Y., Monsalve DM., Castillo-Medina LF., Rodríguez Y., Pacheco Y., Haslstead S., Willison HJ., Anaya JM., Ramírez-Santana C. (2018). Autoimmune Neurological conditions Associated with Zika Virus infection. *Front. in Mol. Neurosci.* 11 (116):1-14. doi: 10.3389/fnmol.2018.00116.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00116/full>

Aiello A, Gianessi F, Percario ZA, Affabris E. (2019). An emerging interplay between extracellular vesicles and cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 51:49-60. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.12.003

Andaloussi EL, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 12(5), 347–357. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrd3978>

Anderson, M. R., Kashanchi, F., & Jacobson, S. (2016). Exosomes in Viral Disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 13(3), 535–546. doi:10.1007/s13311-016-0450-6  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s13311-016-0450-6>

Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in immunology*, 5, 442. doi:10.3389/fimmu.2014.00442.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00442/full>

Aslam, M., Ahmad, N., Srivastava, R., & Hemmer, B. (2012). TNF-alpha induced NFkB signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells. *Cytokine*, 57(2), 269-275. doi:10.1016/j.cyto.2011.10.016.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043466611008039?via%3Dihub>

Ayala-Nunez N.V., Follain G., Delalande, F., Hirschler, A., Partiot, E., Hale G. L., Bollweg B.C., Roels J., Chazal M., Bakoa F., Carocci M., Bourdoulous S., Faklaris O., Zaki SR., Eckly A., Uring-Lambert B., Doussau F., Cianferani S., Carapito C., Jacobs F.M.J., Jouvenet N., Goetz J.G. & Gaudin R. (2019). Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. *Nat Commun*, 10 (4430), 1-16.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12408-x>

Boyer S., Calvez E., Chouin-Carneiro T., Diallo D., & Failloux A.-B. (2018). An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*, 20:646-660. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>

Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet H.P., Alpha S.A. & Musso, D. (2014). Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(6), 1085-1086. doi:10.3201/eid2006.140138 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856001-zika-virus-french-polynesia-south-pacific-2013/>

Castro DM, Mapunda JA, Vladymyrov M and Engelhardt B (2019). Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers. *En t. J. Mol. Sci.*, 20 (21), 5372 doi: [10.3390/ijms20215372](https://doi.org/10.3390/ijms20215372)

Dalvi, P., Sun, B., Tang, N. & Pulliam L. (2017) Immune activated monocyte exosomes alter microRNAs in brain endothelial cells and initiate an inflammatory response through the TLR4/MyD88 pathway. *Sci Rep* 7, 9954. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10449-0>

Daßler-Plenker, J., Küttner, V., & Egeblad, M. (2020). Communication in tiny packages: Exosomes as means of tumor-stroma communication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(2), 188340. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188340 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304419X1930201X?via%3Dihub>

de Carvalho, G. C., Borget, M. Y., Bernier, S., Garneau, D., da Silva Duarte, A. J., & Dumais, N. (2019). RAGE and CCR7 mediate the transmigration of Zika-infected monocytes through the blood-brain barrier. *Immunobiology*, 224(6), 792-803. doi: [10.1016/j.imbio.2019.08.007](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.08.007)

Devhare P, Meyer K, Steele R, Ray RB, Ray R, (2017). Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. *Cell Death Dis*, 8(10):e3106 doi: [10.1038/cddis.2017.517](https://doi.org/10.1038/cddis.2017.517)

Dirección General de Epidemiología, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Secretaría de Salud, Gobierno de México. (2020) Casos Confirmados de Enfermedad por Virus del Zika, Semana epidemiológica 31. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/569057/Cuadro\\_Casos\\_ZIKA\\_y\\_Emb\\_SE3\\_1\\_2020.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/569057/Cuadro_Casos_ZIKA_y_Emb_SE3_1_2020.pdf)

Dropulic D. y Masters CL (1990). Entry of neurotropic arboviruses into the central nervous system: an in vitro study using mouse brain endothelium. *The Journal of Infectious Diseases*; 161(4):685-691. doi: [10.1093/infdis/161.4.685](https://doi.org/10.1093/infdis/161.4.685)

Foo SS, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang L, Choi Y, Yoo JS, Ge J, Cheng G, Bonnin A, Nielsen-Saines K, Brasil P, Jung JU. (2017). Asian zika virus strain target CD14<sup>+</sup> blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol* 2(11):1558-1570. doi: [10.3410/f.729079402.793537741](https://doi.org/10.3410/f.729079402.793537741)

Förster C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130(1):55–70. doi: [10.1007/s00418-008-0424-9](https://doi.org/10.1007/s00418-008-0424-9)

Gebraad, A., Kornilov, R., Kaur, S., Miettinen, S., Haimi, S., Peltoniemi, H., ... & Seppänen-Kajansinkko, R. (2018). Monocyte-derived extracellular vesicles stimulate cytokine secretion and gene expression of matrix metalloproteinases by mesenchymal stem/stromal cells. *The FEBS J*, 285(12), 2337-2359. doi: [10.1111/febs.14485](https://doi.org/10.1111/febs.14485)

Gregory CJ., Oduyebo T., Brault AC., Brooks JT., Chung KW., Kuehnert MJ., Mead P., Meaney-Delman D., Rabe I., Staples E., Petersen R. (2017). Modes of transmission of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases*; 10:5875-83. doi:[10.1093/infdis/jix396](https://doi.org/10.1093/infdis/jix396)

Greene C & Campbell M (2016). Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers*, 4(1), e1138017. doi: [10.1080/21688370.2015.1138017](https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1138017)

Gupta A. y Pulliam L. (2014). Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J of Neuroinflammation*, 11:68. doi: [10.1186/1742-2094-11-68](https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-68)

Gyorgy B, Szabó TG., Pasztoi M., Pal Z., Misjak P., Aradi B., Laszlo V., Pallinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzas EI. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:2667-2688. doi; <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>

Hills SL., Fischer M., Petersen LR. (2017). Epidemiology of Zika Virus Infection. *J Infect Dis*, 216 (S10):S868-S874. doi: [10.1093/infdis/jix434](https://doi.org/10.1093/infdis/jix434)

Hurtado-Alvarado G, Becerril-Villanueva E, Contis-Montes de Oca A, Domínguez-Salazar E, Salinas-Jazmín N, Pérez-Tapia SM, Pavon L, Velázquez-Moctezuma J, Gómez-González B. (2017). The ying/yang of inflammatory status: Blood-brain barrier regulation during sleep. *Brain Behav and Immun.* 69:154-166. [10.1016/j.bbi.2017.11.009](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.009)

- Hurtado-Alvarado G, Domínguez-Salazar E, Velázquez-Moctezuma J, Gómez-González B (2016). A2A Adenosine Receptor Antagonism Reverts the Blood-Brain Barrier Dysfunction Induced by Sleep Restriction. PLoS ONE 11(11): e0167236. [10.1371 / journal.pone.0167236](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167236)
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature reviews. Immunology*, 17(6), 349–362. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.28>
- Jurado, K. A., & Iwasaki, A. (2017). Zika virus targets blood monocytes. *Nature Microbiology*, 2(11), 1460-1461. doi: [10.1038 / s41564-017-0049-7](https://doi.org/10.1038/s41564-017-0049-7)
- Khan, G., Ahmed, W., & Philip, P. S. (2017). Exosomes and Their Role in Viral Infections. Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases. Doi: [10.5772/intechopen.69397](https://doi.org/10.5772/intechopen.69397)
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., & Dye, C. (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(9), 675–686C. doi: [10.2471/BLT.16.171082](https://doi.org/10.2471/BLT.16.171082)
- Kuhn RJ. (2012). Chapter 2: Flavivirus Virion Structure. En Pei-Yong Shi, *Molecular virology and control of Flaviviruses*. En Pei-Yong Shi, *Molecular Virology and control of Flaviviruses* (9-20). Norfolk, UK. Caister Academic Press. ISBN: 978-1-904455-92-9
- Li F., Wang Y., Yu L., Cao S, Wang K., Yuan, Wang C., Wang K, Cui M., Fu ZF. (2015). Viral infection of the central nervous system neuroinflammation precedes blood-brain barrier disruption during Japanese encephalitis virus infection. *J Virol*. 89(10):5602-5614. doi:10.1128 / JVI.00143-15 <http://jvi.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=25762733>
- Li JJ, Wang B, Kodali MC, Chen C, Kim E, Patters BJ, Lan L, Kumar S, Wang X, Yue J, Liao F-F. (2018). In vivo evidence for the contribution of the peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1):8. doi: [10.1186/s12974-017-1038-8](https://doi.org/10.1186/s12974-017-1038-8)
- Liu J, Li Q, Li X, Qiu Z, Li A, Liang W, Chen H y cols. (2018). Zika virus envelope protein induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis via intrinsic cell death signaling pathway in neuroendocrine PC12 cells. *Int J Biol Sci*. 14(9):1099-1108. doi: [10.7150 / ijbs.26400](https://doi.org/10.7150/ijbs.26400)

Liu T, Lian LC., Wang CC., Liu HC, Chen WJ. (2008). The blood-brain barrier in the cerebrum is the initial site for Japanese Encephalitis Virus entering the central nervous system. *Journal of Neurovirology*; 14(6):514-521. doi: [10.1080/13550280802339643](https://doi.org/10.1080/13550280802339643)

Li, T. R., Wang, X. N., Sheng, C., Li, Y. X., Li, F. Z., Sun, Y., & Han, Y. (2019). Extracellular vesicles as an emerging tool for the early detection of Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*, 184, 111175. doi: [10.1016/j.mad.2019.111175](https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.111175)

Liu Z, Zhou T, Lai Z, Zhang Z, Jia Z, Zhou G, Williams T, Xu J, Gu J, Zhou X, Lin L, Yan G, Chen X-G (2017) Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes as Zika virus vectors, China. *Emerg Infect Dis* 23(7):1085–1091. doi: [10.3201 / eid2307.161528](https://doi.org/10.3201/eid2307.161528)

Lossinsky AS. y Shivers RR. (2004). Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions review. *Histol Histopathol*; 19(2):535-564. doi: [10.14670/HH-19.535](https://doi.org/10.14670/HH-19.535)

Mantle, J. L., Min, L., & Lee, K. H. (2016). Minimum Transendothelial Electrical Resistance Thresholds for the Study of Small and Large Molecule Drug Transport in a Human in Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Molecular pharmaceutics*, 13(12), 4191–4198. doi: [10.1021/acs.molpharmaceut.6b00818](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00818)

Martínez-Rojas P. (2017) Participación de exosomas derivados de monocitos humanos en el proceso proinflamatorio durante la infección por el virus Dengue. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (Tesis de Maestría).

Martínez-Rojas, P. P., Quiroz-García, E., Monroy-Martínez, V., Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F., & Ruiz-Ordaz, B. H. (2020). Participation of Extracellular Vesicles from Zika-Virus-Infected Mosquito Cells in the Modification of Naïve Cells' Behavior by Mediating Cell-to-Cell Transmission of Viral Elements. *Cells*, 9(1), 123. doi: [10.3390/cells9010123](https://doi.org/10.3390/cells9010123)

Mateos-Rodríguez J. (2016) Estudio de la posible transmisión viral por microvesículas derivadas de monocitos humanos durante la infección por el virus Dengue. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (Tesis de Maestría).

Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M. L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V. M., Couplier, M., Missé,



- D., Jouvenet, N., Tabibiazar, R., Gressens, P., Schwartz, O., & Amara, A. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell reports*, 18(2), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>
- Michlmayr D., Andrade P., González K., Balmaseda A. y Harris E. (2017). CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nature microbiology*, 2(11), 1462–1470. doi: [10.1038/s41564-017-0035-0](https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0)
- Mladinich, M. C., Schwedes, J., & Mackow, E. R. (2017). Zika virus persistently infects and is basolaterally released from primary human brain microvascular endothelial cells. *mBio*, 8(4), e00952-17. doi: [10.1128/mBio.00952-17](https://doi.org/10.1128/mBio.00952-17)
- Mlakar J., Korva M., Tul N., Popovic M., Poljsak-Prijatelj, M., Mras J., Kolenc M., Rus KR, Vitponik TV, Vodusek VF, Vizjak A., Pizen J., Petrovek M., Zupanc TA. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med*; 374:951-958. doi: 10.1056/NEJMoa1600651. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1600651>
- Muñoz, L. S., Parra, B., Pardo, C. A., & Neuroviruses Emerging in the Americas Study (2017). Neurological implications of Zika virus infection in adults. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl\_10), S897–S905. doi: [10.1093/infdis/jix511](https://doi.org/10.1093/infdis/jix511)
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical microbiology reviews*, 29(3), 487–524. doi: [10.1128/CMR.00072-15](https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15)
- Musso D, Ko AI, Baud D. Zika Virus Infection - After the Pandemic. *N Engl J Med*. 2019;381(15):1444–1457. doi: [10.1056/NEJMra1808246](https://doi.org/10.1056/NEJMra1808246)
- Nagano, T., Katsurada, M., Dokuni, R., Hazama, D., Kiriū, T., Umezawa, K., Kobayashi K., Nishimura, Y. (2019). Crucial role of extracellular vesicles in bronchial asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2589. Doi: [10.3390/ijms20102589](https://doi.org/10.3390/ijms20102589)
- Neal JW. (2014). Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS?. *J of Infect*; 69(3):203-215. doi: [10.1016/j.jinf.2014.05.010](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.05.010)
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., ... Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 161(3), 653–660. doi: [10.1083/jcb.200302070](https://doi.org/10.1083/jcb.200302070)

- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.*, 19(12), 1584-1596. doi: [10.1038/nm.3407](https://doi.org/10.1038/nm.3407)
- Ohtsuki, S., Yamaguchi, H., Katsukura, Y., Asashima, T., & Terasaki, T. (2008). mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *Journal of Neurochemistry*, 104:147-154. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05008.x <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17971126/>
- Organización Mundial de la Salud: alerta epidemiológica, 2015. Disponible en <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-may-7-cha-alerta-epi-virus-zika.pdf>
- Patarroyo M. (1994). Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue. *Immunobiology*, 191(4-5), 474–477. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80453-5](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80453-5)
- Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
- Raposo G, Nijman H.W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding CV., Melief C.J., Geuze H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.*, 183(3):1161-1172.
- Rey, F. A., Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2017). Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. *Current opinion in virology*, 24, 132-139. doi: [10.1016/j.coviro.2017.06.009](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.009)
- Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 195–208. doi: [10.1038/nri3622](https://doi.org/10.1038/nri3622)
- Roe K, Orillo B, Verma S. (2014) West Nile Virus-Induced Cell Adhesion Molecules on Human Brain Microvascular Endothelial Cells Regulate Leukocyte Adhesion and Modulate Permeability of the *In Vitro* Blood-Brain Barrier Model. *PLoS ONE* 9(7), e102598. doi: [10.1371/journal.pone.0102598](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102598)
- Rodríguez-Murcia AC (2017). Participación de las micropartículas endoteliales en la neuropatogénesis durante la infección por el virus dengue. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (Tesis de Maestría)
- Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, Langsjoen RM, Slobodan Paessler, Vasiakis N and Weaver S, (2016). Characterization of a novel murine model to study zika virus. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 94(6):1362-1369. Doi: [10.4269/ajtmh.16-0111](https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111)

- Rossin G., Landini MP., Gelsomino F., Sambri V., Varani S. (2013). Innate host response to West Nile Virus: implications for central nervous system immunopathology. *World J Virol*; 2(2): 49-56. Doi: [10.5501/wjv.v2.i2.49](https://doi.org/10.5501/wjv.v2.i2.49)
- Shi, Y., & Gao, G. F. (2017). Structural biology of the Zika virus. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(6), 443-456. Doi: [10.1016/j.tibs.2017.02.009](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009)
- Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports*, 16(1), 24-43. Doi: [10.15252/embr.201439363](https://doi.org/10.15252/embr.201439363)
- Sirohi D., and Kuhn RJ. (2017). Zika virus structure, maturation and receptors. *J of Infect Dis*; 216(S10): S935-S944. Doi: [10.1093/infdis/jix515](https://doi.org/10.1093/infdis/jix515)
- Song, B.-H., Yun, S.-I., Woolley, M., & Lee, Y.-M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 308, 50-64. Doi: [10.1016/j.jneuroim.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001)
- Sterzenbach, U., Putz, U., Low, L. H., Silke, J., Tan, S. S., & Howitt, J. (2017). Engineered exosomes as vehicles for biologically active proteins. *Molecular Therapy*, 25(6), 1269-1278. Doi: [10.1016/j.ymthe.2017.03.030](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.030)
- Tang, N., Sun, B., Gupta, A., Rempel, H., & Pulliam, L. (2016). Monocyte exosomes induce adhesion molecules and cytokines via activation of NF- $\kappa$ B in endothelial cells. *The FASEB Journal*, 30(9), 3097-3106. <https://doi.org/10.1096/fj.201600368RR>
- Thaler, B., Hohensinner, P. J., Krychtiuk, K. A., Matzneller, P., Koller, L., Brekalo, M., Maurer, G., Huber, K., Zeitlinger, M., Jilma, B., Wojta, J., & Speidl, W. S. (2016). Differential in vivo activation of monocyte subsets during low-grade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep30162>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... Atkin-Smith, G. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. Doi: [10.1080 / 20013078.2018.1535750](https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750)

- Van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., ... & Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and-dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell*, 21(4), 708-721. Doi: [10.1016/j.devcel.2011.08.019](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019)
- Van Niel G., D'Angelo G. and Raposo G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev. Mol Cell Biol* 19(4):213-228. Doi: [10.1038/nrm.2017.125](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125)
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, behavior, and immunity*, 60, 1-12. Doi: [10.1016/j.bbi.2016.03.010](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010)
- Villaseñor, R., Lampe, J., Schwaninger, M., & Collin, L. (2019). Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood–brain barrier. *Cell Mol Life Sci*, 76(6), 1081-1092. Doi: [10.1007/s00018-018-2982-x](https://doi.org/10.1007/s00018-018-2982-x)
- Wen D, Ls, Dong F, Zhang Y, Lin Y, Wang J, Zou Z, Zheng A (2018). N-glycosylation of viral E protein is determinant for vector midgut invasion by Flaviviruses. *mBio*, 9(1), e00046-18. Doi: [10.1128/mBio.00046-18](https://doi.org/10.1128/mBio.00046-18)
- Yang, C., Hawkins, K. E., Doré, S., & Candelario-Jalil, E. (2019). Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *American journal of physiology. Cell physiology*, 316(2), C135–C153. Doi: [10.1152/ajpcell.00136.2018](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00136.2018)
- You, Y., & Ikezu, T. (2019). Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, 130, 104512. Doi: [10.1016/j.nbd.2019.104512](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104512)
- Zhou W., Woodson M., Naupane B., Bai F., Sherman MB., Choi KH., Neelakanta G., Sultana H. (2018). Exosomes serve as novel modes of tick-borne Flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuron cells. *PLoS Pathog*; 14(1):e1006764. Doi: [10.1371/journal.ppat.1006764](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006764)