



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DE LA INTERCOMUNICACIÓN CELULAR MEDIADA
POR VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE LA
INFECCIÓN POR *FLAVIVIRUS***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. ANTONIO IVAN ROVELO GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. BLANCA HAYDE RUÍZ ORDAZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México, marzo 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

que presenté para obtener el grado de ----Maestría-----es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Antonio Ivan Rovelo Guzmán 519021033

Agradecimientos

A mi tutora, la doctora Blanca H. Ruiz Ordaz por permitirme llevar a cabo el proyecto de maestría en su laboratorio, su asesoramiento y sus conocimientos sobre el método científico, sobre todo el apoyo para mi titulación.

A los doctores Julio César Carrero Sánchez e Ingeborg Becker Fauser quienes formaron parte de mi comité tutor, por sus consejos, su tiempo invertido y sus observaciones en los tutorales para mejorar mi proyecto.

A la doctora Verónica Monroy Martínez, técnico académico en el laboratorio de la Dra. Blanca Ruiz, por su asesoramiento en el ensayo de placa lítica, así como la estadía amena en los experimentos.

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.

Al departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, a la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno, por las atenciones brindadas en el proyecto para poder realizar la microscopia electrónica de transmisión.

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 células C6/36, así como en la extracción de vesículas extracelulares, y la microscopía electrónica de transmisión; sus consejos, las discusiones y asesoramiento sobre el método científico enfocado en mi proyecto.

A mi compañera de laboratorio, la M. en C. Jessica Janeth Avilez Avilez por su asesoría en el modelo de permeabilidad de la BHE, el manejo animal del modelo utilizado en el proyecto, así como la lectura e interpretación de resultados por fluorescencia.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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, mi familia.

La historia nunca dice adiós. Lo que dice es un hasta luego.

- Eduardo Galeano

Agradecimientos especiales a:

Mi familia materna, mi abuelita, mi tía, mi tío y mi prima quienes siempre estuvieron al pendiente de mis estudios y de mi bienestar emocional.

A Diego Armando Muñoz Pérez, porque sin tu apoyo incondicional no hubiera podido concluir la fase experimental de mi proyecto, donde quiera que estés espero que estés orgulloso de mis avances, gracias por todo.

A mis compañeros de laboratorio, Ofelia, Jessica y Pablo, por su compañerismo, solidaridad y grandes momentos que pasamos en mi estadía.

A mi compañera de maestría, vecina y amiga María Guadalupe Patiño Gaitán porque sin tu apoyo no hubiera podido sobrevivir en la inmensa CDMX.

A mis amigos Josué, Jenny, Claudia, Yoselin, Chucho, porque siempre creyeron en mí y me apoyaban bastante para poder dar este gran paso.

Índice

Summary.....	8
Abreviaturas.....	9
Introducción.....	12
El Zika.....	12
Distribución mundial.....	12
Transmisión viral.....	13
Manifestaciones clínicas.....	14
Virus Zika.....	15
Ciclo de replicación viral.....	17
Replicación viral en el vector.....	19
Vesículas extracelulares y virus.....	22
Exosomas: Composición, biogénesis y marcadores específicos.....	22
Vesículas extracelulares en infecciones virales.....	25
Exosomas y <i>Flavivirus</i>	26
<i>Flavivirus</i> neurotrópicos.....	29
Barrera hematoencefálica.....	29
Barrera hematoencefálica y neuro inflamación.....	31
Barrera hematoencefálica en infección por ZIKV.....	32
Planteamiento del problema.....	33
Hipótesis.....	34
Objetivo General.....	35
Objetivos particulares.....	35
Diseño experimental.....	37
Materiales y métodos.....	38
Líneas celulares y virus.....	38
Titulación viral por ensayo de placa lítica.....	38
Amplificación de ZIKV en células C6/36.....	39
Infección de células C6/36 con ZIKV.....	40
Determinación de la proteína E de células infectadas por ZIKV mediante Citometría de Flujo.....	40

Determinación de la tetraspanina CD63 en células C6/36 infectadas con ZIKV	41
Preparación de Suero Fetal Bovino reducido en exosomas	42
Aislamiento de VEs provenientes de células infectadas con ZIKV, mediante ultracentrifugación diferencial	42
Detección de exosomas CD63 ⁺ provenientes de células C6/36 infectadas con ZIKV mediante acoplamiento a perlas paramagnéticas.....	43
Caracterización de los exosomas de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV) mediante microscopia electrónica de transmisión	44
Determinación de proteína de exZIKV mediante BCA.....	45
Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la infección por ZIKV en un modelo murino.....	46
Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un modelo murino por exZIKV	49
Análisis estadístico.....	49
Resultados	50
Titulación de ZIKV por ensayo de placa lítica.....	50
Cinética de infección de células C6/36 con ZIKV mediante la detección de la proteína E viral por citometría de flujo	51
Detección de la tetraspanina CD63 en células C6/36 infectadas con ZIKV	57
Detección de exosomas CD63 ⁺ provenientes de células C6/36 infectadas con ZIKV, utilizando perlas paramagnéticas	61
Caracterización de exosomas de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV) mediante microscopia electrónica de transmisión	63
Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la infección por ZIKV en un modelo murino.....	64
Evaluación del inóculo de exZIKV en un modelo murino para la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	68
Discusión	73
Conclusiones parciales	85
Referencias bibliográficas	86

Summary

The blood brain barrier (BBB) is a natural barrier comprised by specialized cells, localized in the brain which regulates the exchange of different molecules between the cerebrospinal fluid and the bloodstream. The BBB can be disrupted during viral infection, i.e., with Zika virus (ZIKV); favoring the ZIKV spread with the presence of encephalitis, microcephaly, and an autoimmune disease called Guillain-Barré Syndrome. The ZIKV replicates inside mosquito cells, and as a natural process, the cells can release extracellular vesicles like exosomes. We evaluated the effect of exosomes released by ZIKV-infected mosquito cells in the BBB permeability; if there is any disruption of BBB in presence of exosomes or the virus itself in an *in vivo* mice model was the aim of the investigation. Male BALB/c mice were intra-peritoneally injected with exosomes of ZIKV infected C6/36 mosquito cells. For the BBB permeability assays we tested the cerebellum, cortex, and subcortical regions of the mice brain, measuring the tracers (Evans blue and sodium fluorescein), previously administrated by intracardiac route. We determined the tissue tracer concentration in the cerebral regions after different time periods with either ZIKV or exosomes (released from larvae mosquito infected cells) doses. We founded those exosomes liberated from infected ZIKV cells increased BBB permeability.

Abreviaturas

AE: Azul de Evans

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

BSA: Albúmina sérica bovina

BHE: Barrera Hematoencefálica

CD: Clúster de diferenciación

CF: Citometría de Flujo

CMV: Cuerpo Multivesiculado

DC-SIGN: Molécula número 3 tipo no integrina de unión intercelular específica de células dendríticas

DENV: Virus del Dengue

DI: Dominio 1

DII: Dominio 2

DIII: Dominio 3

ESCRT: Complejos de Clasificación Endosomal requeridos para el Transporte

ExZIKV: Exosomas provenientes de células infectadas con ZIKV

FL: Asa de fusión

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GW4869: Inhibidor de la esfingomielinasa SPMD3

HCV: Virus de la Hepatitis C

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IP: Administración vía intraperitoneal

JEV: Virus de la Encefalitis Japonesa

K208: Residuo número 208 de lisina

L-15: Medio Leibovitz

LGTV: Virus Langat

MEC: Matriz Extracelular

MOI: Multiplicidad de infección

N154: Residuo número 154 de asparagina

Na-F: Sodio fluoresceína

NS1: Proteína no estructural viral 1

NS2A: Proteína viral no estructural 2A

NS2B: Proteína viral no estructural 2B

NS3: Proteína viral no estructural 3

NS4A: Proteína viral no estructural 4A

NS4B: Proteína viral no estructural 4B

NS5: Proteína viral no estructural 5

NVU: Unidad neurovascular

OMS: Organización Mundial de la Salud

PI: Post infección

RE: Retículo endoplasmático

RPDR: Polimerasa de ARN dependiente de ARN

SCZ: Síndrome congénito por Zika

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

SNARE: Soluble NSF Attachment Protein (SNAP) Receptor

SNC: Sistema Nervioso Central

SMPD3: Fosfodiesterasa de esfingomielina 3

TAM: Familia de proteínas receptor de tirosina cinasa

TBEV: Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas

TEER: Resistencia eléctrica transendotelial

TEM¹: Microdominios ricos en tetraspaninas

TEM²: Microscopia electrónica de transmisión

TIM: Proteínas de dominio transmembranal de inmunoglobulina y mucina

TJP: Proteínas de unión estrecha

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TSP: Tetraspaninas

VEs: Vesículas extracelulares

VILs: Vesículas Intraluminales

WNV: Virus del Nilo occidental

YFV: Virus de la Fiebre Amarilla

ZIKV: Virus Zika

ZO-1: Zónula Ocludens 1

Introducción

El Zika

Distribución mundial

La enfermedad del Zika es una arbovirosis que se presenta en regiones tropicales y subtropicales del mundo, ocasionada por el virus Zika (ZIKV), el cual fue aislado por primera vez en los bosques de Zika en Entebbe Uganda en 1947 a partir de un mono *Macacus Rhesus* (Musso & Gubler, 2016). El primer caso reportado en humanos, en 1954 se presentó en un paciente nigeriano y por poco más de medio siglo no se presentaron otros casos de interés clínico asociados al virus. Un nuevo brote fue reportado en 2007 en la isla Yap de los Estados Federados de la Micronesia, en el cual, los pacientes presentaron signos y síntomas autolimitantes e inespecíficos. La cepa responsable de este brote se clasificó como linaje asiático, debido a que se relacionaba con una cepa aislada en Malasia en 1966. En el brote de la Polinesia francesa en el 2013, el 1% de neonatos con microcefalia provenían de mujeres que habían tenido Zika durante el primer trimestre del embarazo (Carod-Artal, 2018; Johansson y cols., 2016). Las manifestaciones neurológicas del Zika en neonatos han sido agrupadas en el síndrome congénito por Zika (SCZ) mientras que en adultos se han reportado casos de encefalitis, meningoencefalitis, encefalopatías, complicaciones cerebrovasculares y neuropatías como el síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Song y cols., 2017).

En 2015, el ZIKV fue detectado en el Continente Americano, los primeros casos se reportaron en Brasil; de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) hubo aproximadamente 1.5 millones de personas infectadas por ZIKV; en donde además de ocasionar un cuadro clínico autolimitante, se presentaron casos graves con daño

neurológico, con un aumento de casos de microcefalia (Song y cols., 2017), entre otras afectaciones congénitas, lo cual condujo a que se emitiera una alerta epidemiológica por parte de la Organización Mundial de la Salud (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2015).

A finales del 2015, el primer caso en México de enfermedad por ZIKV fue detectado el 18 de noviembre de 2015; Para el 2021 se habían reportado 12958 casos confirmados de infección por ZIKV, de los cuales 7139 son en embarazadas (Sánchez-González y cols., 2016; Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2021).

Transmisión viral

Actualmente se conoce que, el ZIKV se transmite de forma tanto vectorial como no vectorial. La transmisión no vectorial se caracteriza por el contacto con fluidos corporales en los que se han encontrado partículas virales, por ejemplo, en sangre, leche materna, orina y semen; también se ha reportado la transmisión vertical, es decir, la transmisión de madre a hijo durante el embarazo (Counotte y cols., 2018; Lin y cols., 2018; Musso & Gubler, 2016; Sharma & Lal, 2017).

Sin embargo, la principal forma de transmisión es, la vectorial, ocasionada por mosquitos del género *Aedes*, principalmente por *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. hensilli*, *A. polynesiensis*. Este género tiene dos ciclos: el urbano y el selvático (Lin y cols., 2018). En el ciclo urbano, el humano es el principal objetivo de los mosquitos, ya que éstos se alimentan de la sangre para obtener los nutrientes necesarios para el desarrollo de los huevecillos (Petersen y cols., 2016).

Manifestaciones clínicas

El ZIKV tiene un periodo de incubación de entre 2 y 7 días. La mayoría de las personas infectadas por ZIKV son asintomáticas, aproximadamente en el 18% de los casos se presenta sintomatología. El ZIKV generalmente produce un cuadro clínico leve, con signos y síntomas autolimitantes e inespecíficos, como fiebre, urticaria, artralgias, mialgias, conjuntivitis. Sin embargo, también existe la forma grave de la enfermedad que afecta aproximadamente al 10% de las personas sintomáticas (Krauer y cols., 2017). Una de las principales características de la forma grave, es el daño a nivel del sistema nervioso central. En los neonatos se presenta el SCZ, en el cual se pueden presentar calcificaciones intracraneales, diferentes anormalidades en el cerebro, artrogriposis, pie deforme, y microcefalia; en los adultos se puede presentar encefalitis y también el Síndrome de Guillain-Barré (Rasmussen y cols., 2016; Saiz y cols., 2016; Uncini y cols., 2017). El SGB es una enfermedad autoinmune que se presenta de forma aguda y afecta principalmente a los nervios periféricos con degeneración de las vainas de mielina, provocando pérdida de fuerza muscular, dolor neuropático y parálisis ascendente (Esposito & Longo, 2017).

La forma grave de la enfermedad, así como las múltiples formas de transmisión (vectorial y no vectorial), instan a la OMS para poner énfasis en la investigación básica y clínica en la enfermedad y que además se emita la declaración de una emergencia de interés internacional (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2015) para el combate del Zika.

Virus Zika

El ZIKV es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus*. Su material genómico consiste en ARN monocatenario de sentido positivo con aproximadamente 11,000 nucleótidos, que codifican para una poliproteína de 3243 amino ácidos que posteriormente es procesada para generar tres proteínas estructurales: la proteína de envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la proteína de la cápside (C); y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 que son necesarias para la replicación del virus (Figura 1) (Lin y cols., 2018; Musso & Gubler, 2016; Saiz y cols., 2016).

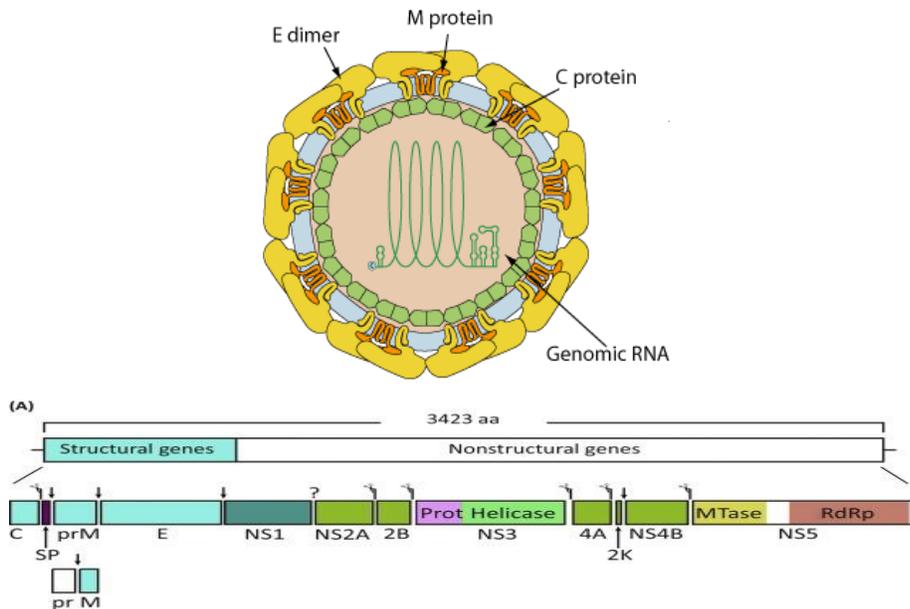


Figura 1. Estructura y genoma de ZIKV. Tomado y modificado de Hsiao-Han, L. y cols. (2018) *Biotechnology Advances* 36:47–53.

Los viriones maduros miden entre 40-50nm, su material genómico está recubierto por la proteína C, la cual a su vez está recubierta por una bicapa lipídica de la membrana del RE de la célula del hospedero, que interacciona con la proteína M y la proteína E. Las proteínas E y M forman una estructura icosaédrica de 180 copias donde se asocian mutuamente en forma de heterodímeros; sus dominios transmembranales son los que se anclan con la membrana lipídica para generar esta estructura altamente organizada. La proteína E tiene cuatro dominios, uno de transmembrana, y dominios DI, DII y DIII. El dominio DI es el que une a los dominios DII y DIII, el dominio DII contiene el “loop” o asa de fusión (FL) que interacciona con la membrana del hospedero durante la entrada del virus, mientras que el dominio DIII es el que tiene el sitio de unión a los distintos tipos de receptores que reconoce el virus (Figura 2) (Saiz y cols., 2016; Shi & Gao, 2017; Sun y cols., 2017).

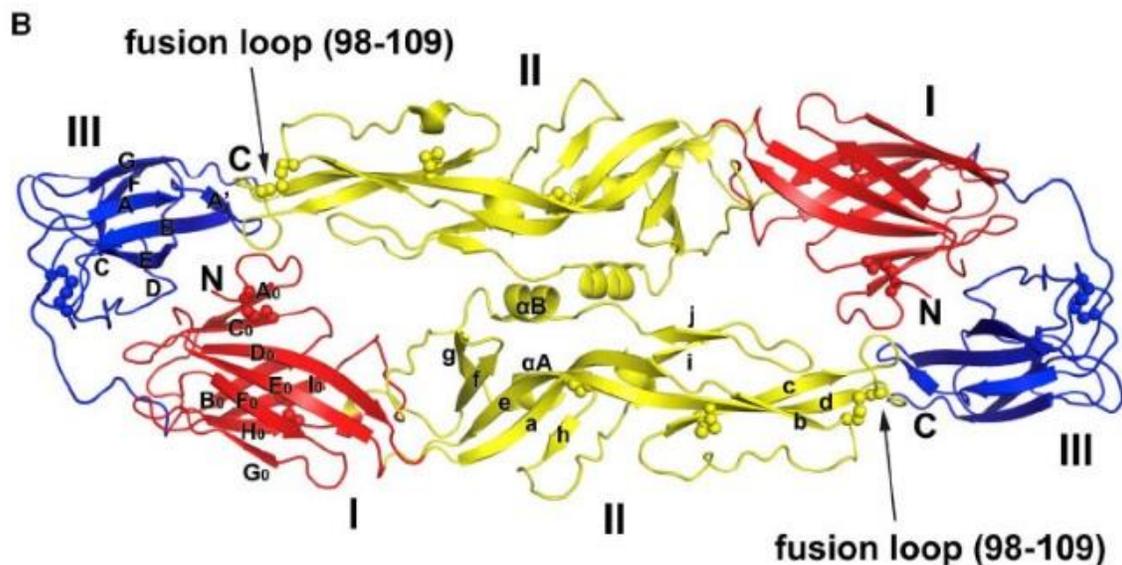


Figura 2. Estructura de la proteína E. Tomado y modificado de (Sun y cols., 2017) y cols. (2017). International Journal of sciences 9.

Ciclo de replicación viral

El ZIKV es capaz de internalizarse en diversas células del humano (monocitos, células endoteliales, neurona) ya a que la proteína E puede interaccionar con diversos receptores, por ejemplo, proteínas de la familia TIM (del inglés T cell immunoglobulin mucin domain) y TAM (Tyro3, Axl y Mer); receptores de heparán sulfato, proteínas de choque térmico, DC-SIGN, entre otros (Heinz & Stiasny, 2017; Perera-Lecoin y cols., 2013; Sirohi & Kuhn, 2017). Se conoce que algunas modificaciones puntuales de la proteína de envoltura viral favorecen la internalización celular del ZIKV. Por ejemplo, a la proteína E se le puede unir ubiquitina en los residuos K281, K63 y K38; siendo los primeros residuos específicos a la proteína E del ZIKV y el residuo K38 común a todos los *Flavivirus*, esta modificación favorece la infección por ZIKV (Giraldo y cols., 2020).

La interacción entre la proteína E viral en células blanco, conduce a la internalización de la partícula viral mediante la formación del endosoma temprano. Una vez que el virus se internaliza, el pH endosomal se acidifica, favoreciendo un cambio conformacional en la proteína E, lo que favorece que se exponga el dominio de fusión (FL) por un reacomodo del DIII. EL FL es el responsable de la interacción de las membranas (viral y endosomal), el cual va acercando las membranas hasta que en un punto las yuxtapone y se forma una estructura en forma de bucle (Figura 3). Estos cambios conformacionales también proveen la energía necesaria para la fusión de las membranas (Lin y cols., 2018; Saiz y cols., 2016). Una vez que se forma el bucle (favoreciendo la fusión de membranas), el virus libera su material genómico al interior de la célula, que posteriormente llega al retículo endoplásmico (RE), donde se traduce en una poliproteína debido a que el ARN

viral funciona como ARNm. Gracias a la maquinaria del hospedero la poliproteína es escindida para producir las proteínas estructurales y no estructurales, una vez producida la ARN polimerasa ARN dependiente produce un ARN de sentido negativo, que sirve como molde para producir múltiples copias del material genómico junto con la maquinaria de la célula huésped. Múltiples copias de ARN de sentido positivo son sintetizadas gracias a la ARN polimerasa. Posteriormente se ensamblan los nuevos viriones inmaduros que se llevan membrana del RE; estos viriones tienen 60 proyecciones triméricas de heterodímeros prM-E, la proteína M contiene el péptido “pr” (Rey y cols., 2017). La maduración de las partículas virales inmaduras se lleva a cabo en la red Trans-Golgi, en donde las proyecciones triméricas cambian a 90 proyecciones diméricas de heterodímeros prM-E para dejar accesible el péptido pr y así pueda ser escindido mediante proteasas tipo furina en el amino terminal del péptido pr y el carboxilo terminal de la proteína M (Rey y cols., 2017; Sirohi & Kuhn, 2017). Por otro lado, en la proteína E se lleva a cabo una glicosilación en el residuo N154 (que conforma el DI, y que en caso de estar alterado afecta de manera importante la entrada del virus a la célula). Una vez que se han generado las modificaciones, se considera que la partícula viral es madura e infectante. Finalmente, los viriones son liberados mediante exocitosis, liberando tanto partículas maduras como inmaduras (Heinz & Stiasny, 2017; Lee & Shin, 2019; Sirohi & Kuhn, 2017).

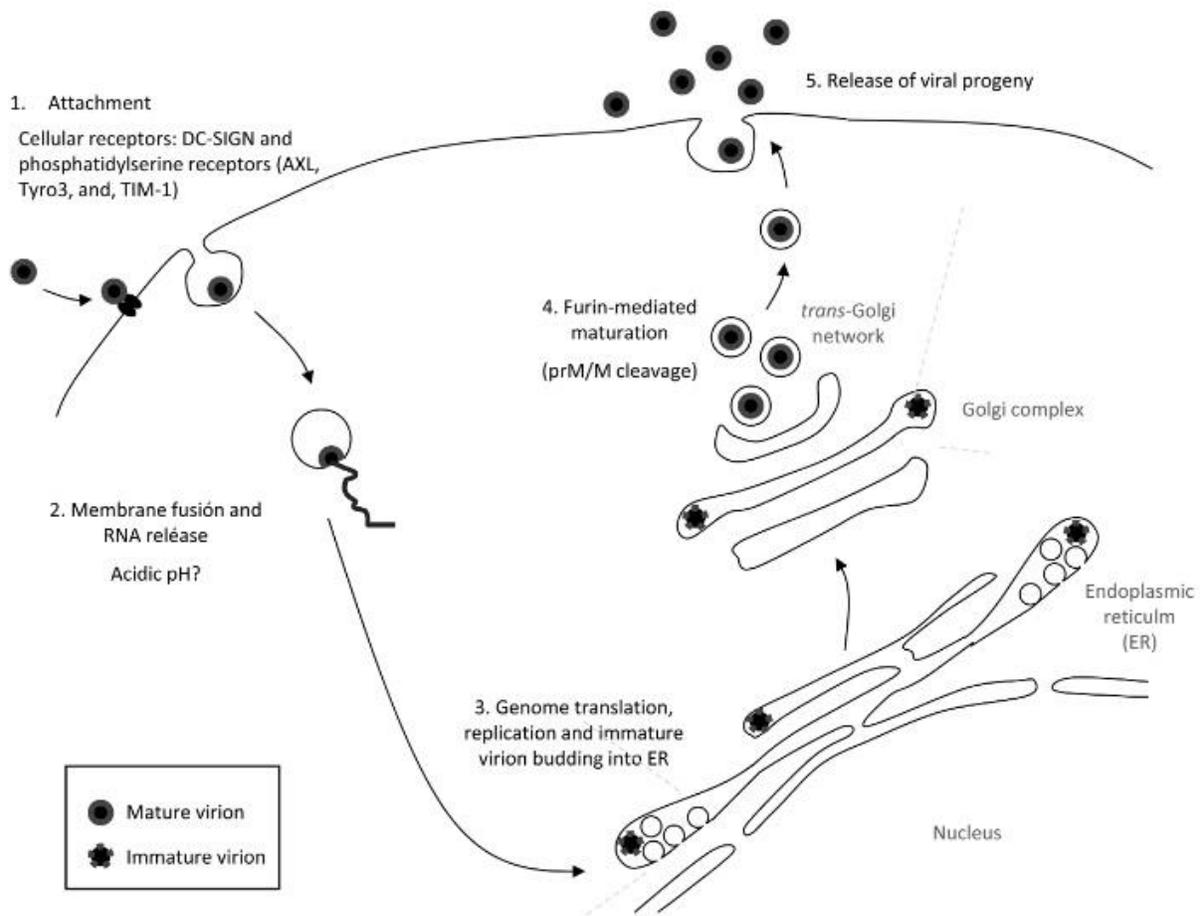


Figura 3. Ciclo de replicación viral. Tomado y modificado de (Saiz y cols., 2016). *Frontiers in microbiology* 7.

Replicación viral en el vector

La principal forma de transmisión del ZIKV es la vectorial, sin embargo, esto no es exclusivo del género *Aedes* (Lin y cols., 2018), ya que otros mosquitos tienen la capacidad de transmitir el virus; de ahí que se favorezca la expansión del virus en la región donde se localizan los mosquitos vectores (áreas tropicales y subtropicales). Las arbovirosis incluyendo a Zika dependen de la competencia del vector, y su capacidad vectorial (Sirohi & Kuhn, 2017). La competencia del vector es la que define la habilidad del mosquito de transmitir determinado virus, asociado con factores genéticos y no

genéticos (Rückert & Ebel, 2018). Es diferente entre las especies de mosquitos, poblaciones locales de la misma especie, incluso entre organismos individuales; también depende en gran medida de las características del virus (Franz y cols., 2015). Cuando el mosquito se alimenta de sangre de una persona infectada con el virus, debe emprender un largo trayecto hasta que se replique y genere nuevos virus listos para infectar a otros hospederos. Para lograrlo, debe entrar y salir de distintas células del mosquito, las cuales van a funcionar como “barreras” (Figura 4) (Rückert & Ebel, 2018). Al entrar el virus en el cuerpo del mosquito, pasa directamente al sistema digestivo, donde debe atravesar el intestino del mosquito, en donde se encuentra la primera barrera la cual es denominada como la barrera de infección del intestino medio (BIIM). Aquí el virus debe internalizarse en las células intestinales y poder llevar a cabo una primera replicación; cuando esto sucede, la nueva progenie viral debe atravesar la siguiente barrera, la cual es denominada como la barrera de escape del intestino medio (BEIM), los viriones no logran traspasarla en ciertos mosquitos; pero en los mosquitos que los virus logran atravesarla, ahora deben atravesar la lámina basal. Posteriormente, los virus entran a los hemocitos, los cuales a su vez los transportan a las glándulas salivales, o a otros tejidos periféricos. Una vez que los viriones interaccionan con las glándulas salivales, estos se encuentran otra barrera denominada barrera de infección de la glándula salival (BIGS), los viriones competentes, pueden llevar a cabo una segunda replicación en células de glándulas salivales, donde deben atravesar las células a través de su paso por la barrera de escape de la glándula salival (BEGS), para finalmente dirigirse a la probóscide, donde podrán infectar a nuevos hospederos (Franz y cols., 2015; Rückert & Ebel, 2018).

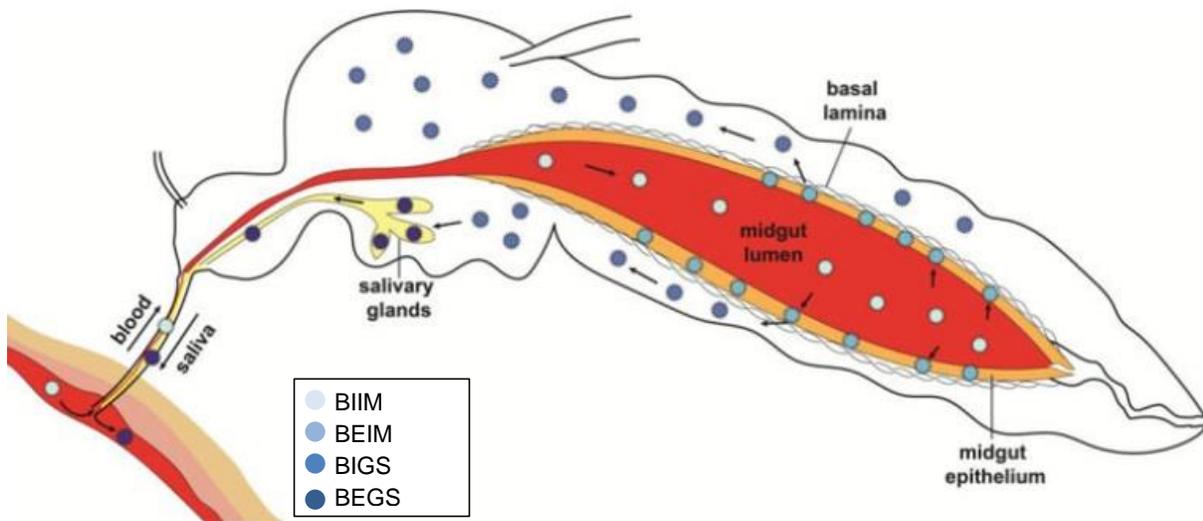


Figura 4. Ciclo de replicación viral en el mosquito. Los puntos de colores representan los viriones a través de las distintas barreras. Tomado y modificado de (Rückert & Ebel, 2018). Trends in parasitology 34:4.

Además, pese a todo el camino que deben atravesar los viriones para poder infectar a nuevos hospederos, la respuesta inmune del mosquito puede intervenir con la competencia del vector en sí y afectar el paso del virus a través de las barreras (Blair & Olson, 2014; Rückert & Ebel, 2018). El mecanismo por ARN de interferencia (ARNi) es el principal mecanismo de defensa ante estímulos ocasionados por virus de ARN, sin embargo, los virus han adquirido estrategias para evadir esta respuesta aumentando así las posibilidades de llegar a las glándulas salivales del mosquito (Blair & Olson, 2014).

Por otro lado, además de la competencia del vector, influye la capacidad vectorial, un concepto crítico adaptado para comprender cómo el virus puede infectar a un hospedero. Entre los factores que dependen de esta característica se encuentran: el inoculo del virus, el número de veces que el vector se alimenta del hospedero en el transcurso de un día, el número de días que sobreviva el vector en los sitios urbanos, el periodo de incubación del virus en el hospedero, y por su puesto la competencia del vector antes descrita

(Kramer & Ciota, 2015; Rückert & Ebel, 2018). Una vez pasando las barreras y logrando una progenie viral exitosa, como anteriormente se mencionó, los virus infectan y activan células diana. Durante el proceso de infección y activación celular se producen distintos efectores celulares, como lo son las vesículas extracelulares (Kalra y cols., 2016; Vora y cols., 2018).

Vesículas extracelulares y virus

Las vesículas extracelulares (VEs) se definen como estructuras extracelulares producidas por cualquier tipo celular en estado fisiológico o patológico. Se componen por una bicapa lipídica, las cuales se clasifican en cuanto a su tamaño y origen biosintético, en: exosomas (<200nm) derivadas de la vía endosomal; micropartículas (200-1000nm) derivadas de la membrana plasmática; y los cuerpos apoptóticos (1000-5000nm) derivados de la fragmentación celular cuando las células entran en apoptosis. Las vesículas extracelulares pueden participar en procesos fisiológicos importantes, ya que pueden mediar la comunicación intercelular debido a que contienen biomoléculas que pueden activar diferentes señales en las células con las cuales interactúan (Kalra y cols., 2016).

Exosomas: Composición, biogénesis y marcadores específicos

Los exosomas son las vesículas extracelulares de menor tamaño (<200nm), que pueden contener tanto en su interior como en la superficie membranal a proteínas, ácidos nucleicos, derivados de lípidos, entre otros. El contenido o cargo exosomal, es dependiente de la célula que les da origen y la condición en la que se forman. Asimismo, las funciones fisiológicas o patológicas dependen de las condiciones antes mencionadas

(Farooqi y cols., 2018). Los exosomas se han encontrado en diferentes fluidos corporales como plasma, saliva, orina, saliva, leche materna, semen, líquido cefalorraquídeo y líquido pleural (Pant y cols., 2012).

Los exosomas se originan a partir de la internalización de moléculas expresadas en la superficie de la membrana, principalmente las tetraspaninas (TSP), como CD9, CD81 y CD63, las cuales, además son utilizadas como biomarcadores exosomales, en especial la TSP CD63 (Ahmed y cols., 2021; Kalra y cols., 2016). La invaginación de la membrana en sitios ricos en colesterol y tetraspaninas (del inglés TEM¹), promueve la formación del endosoma temprano (Figura 5). Posteriormente, se forman las vesículas intraluminales (VIL) del endosoma. Este proceso se puede llevar a cabo de forma dependiente o independiente de los complejos ESCRT (del inglés, Complejos de Clasificación Endosomal requeridos para el Transporte), que incluyen del complejo ESCRT-0 al ESCRT-III. En el caso de la vía dependiente de ESCRT, se invaginan fragmentos del endosoma, iniciando con la selección del cargo mediante el complejo ESCRT 0, el cual, reconoce a proteínas ubiquitinizadas, que se unen a dominios de unión a clatrina y así las biomoléculas son reconocidas y direccionadas para llevarse dentro de las VILs; ESCRT I y II forman la invaginación de las VILs, que además se encargan de desubiquitnizar a las proteínas del cargo; finalmente ESCRTIII se encarga de la escisión de las VILs para que queden dentro del endosoma y adquiere el nombre del cuerpo multivesiculado (CMV) (Farooqi y cols., 2018; Latysheva y cols., 2006; Mathieu y cols., 2019). La vía independiente de ESCRT, también requiere de microdominios de glicoproteínas, esta vía depende de la formación de ceramida a partir de esfingomielinea por esfingomielininasas específicas como SMPD3 y la participación de fosfolipasa D2 para

formar ácido fosfatídico, este compuesto genera balsas lipídicas enriquecidas en colesterol que ayudan a formar las VILs. Esta ruta alterna se demostró bajo la inhibición de los cuatro complejos ESCRT (aunque la morfología de las VILs era aberrante), demostrando que ESCRT es fundamental para una formación correcta de las vesículas extracelulares, asimismo, se observó la participación de otras moléculas como Flotilina-2, Alix, CD63 y colesterol (Kalra y cols., 2016; Kowal y cols., 2014; Mathieu y cols., 2019).

La ruta de formación de exosomas es la secretora, que involucra a GTPasas de la familia Rab (en especial 11 y 27) que direccionan al cuerpo multivesiculado hacia la membrana plasmática para liberar las VILs, también se involucran varias proteínas reguladoras del citoesqueleto, incluida la miosina y el complejo SNARE (soluble NSF attachment protein receptor de sus siglas en inglés), el cual promueve la fusión de la membrana plasmática con la del CMV, de esta forma las VILs son liberadas al espacio extracelular que finalmente se denominan exosomas (Figura 5)(Hadizadeh y cols., 2022). Sin embargo, la formación de VILs coexiste con la ruta de reciclaje y la ruta de degradación, donde la composición rica en colesterol y en TEM¹s determina el reciclaje o secreción, mientras que contenido bajo en lípidos y TEM¹s, direcciona las VILs hacia los lisosomas para su degradación (Alenquer & Amorim, 2015; De Lellis y cols., 2021; Kowal y cols., 2014). La composición de las VILs dependerá en gran medida de la célula productora del exosoma, como proteínas de choque térmico, proteínas del citoesqueleto, lípidos, enzimas, y ácidos nucleicos (principalmente ARNs) que se encuentran mediante estudios del contenido exosomal (Farooqi y cols., 2018; Hadizadeh y cols., 2022).

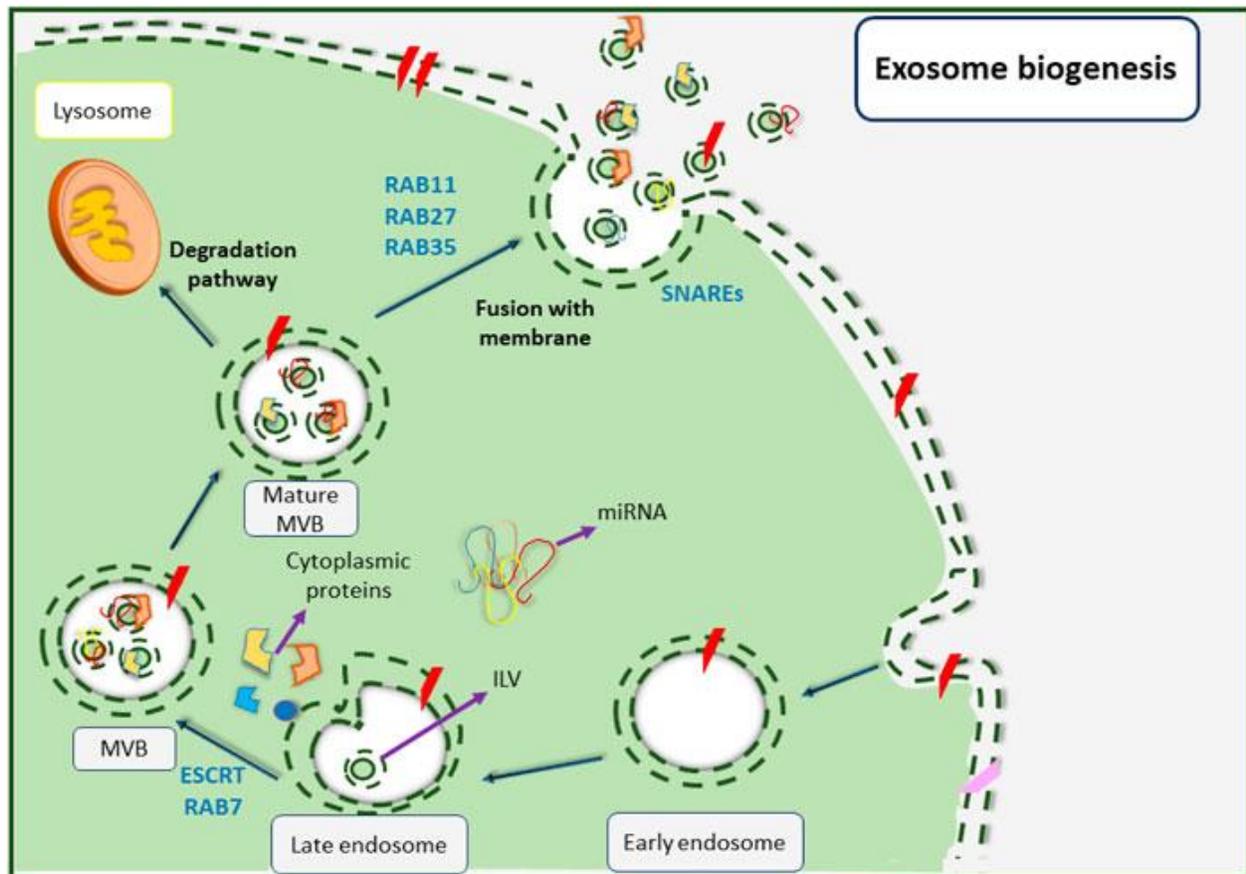


Figura 5. Biogénesis de exosomas. Tomado de (Hadizadeh y cols., 2022). *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 10.

Vesículas extracelulares en infecciones virales

Se ha reportado que los virus pueden interactuar con las VEs de diferentes maneras: a) las infecciones virales alteran el contenido de las VEs así como su liberación, b) los virus pueden utilizar la maquinaria biosintética de las VEs para su progenie viral c) las propias VEs y su contenido juegan un papel importante en la propagación y transmisión de virus (Kutchy y cols., 2020). Los virus utilizan la maquinaria del hospedero para llevar a cabo su replicación y así generar múltiples copias de sí mismo, se ha demostrado que el virus de la hepatitis C (HCV), un miembro de la familia *Flaviviridae* es capaz de incorporar y mantener el genoma viral dentro de las VILs y así ser secretado al medio

extracelular como exosomas con capacidad infectiva, distinto de los viriones, ya que carecen de las proteínas estructurales que lo conforman; por otro lado, se ha observado que los virus utilizan las proteínas de la familia Rab (Anderson y cols., 2016). Se ha reportado que distintos tipos de virus con ARN monocatenario de cadena negativa mantienen niveles constantes de Rab11 (responsable de la fusión del CMV con la membrana de la célula) para favorecer la secreción de exosomas (Alenquer & Amorim, 2015).

Exosomas y *Flavivirus*

Un estudio llevado a cabo por Vora y cols, (2018), demostró que las vesículas extracelulares de artrópodos (particularmente de células de mosquito), pueden contener genoma viral del virus dengue (DENV), y que además, no había virus contaminantes en las fracciones de VEs estudiadas, demostrado mediante crio-microscopía electrónica. Estos exosomas eran capaces de infectar diferentes líneas celulares, los autores demostraron la importancia de un dominio de tetraspanina, el Tsp29fb, necesario para la correcta formación de los exosomas durante la infección con DENV. Observaron que el silenciamiento del gen que codifica para esta TSP también repercutía en una disminución de las cargas virales de estos cultivos.

En nuestro grupo de trabajo, también hemos observado que durante la infección de monocitos humanos con DENV, las células se activan incrementando así la producción de exosomas y, la inducción de citocinas proinflamatorias por la activación de células naïve, hecho importante que puede relacionarse con las complicaciones presentes en el dengue severo (Martínez-Rojas, 2017).

Por otro lado, Zhou y cols., (2018) demostraron que exosomas libres de contaminantes (i.e., partículas virales en suspensión) provenientes de células de garrapata previamente estimuladas con virus Langat (LGTV), (un virus homólogo al virus de encefalitis transmitido por garrapata ([TBEV]), contenían material genómico, proteína E y NS1 virales, además, eran capaces de infectar células naïve en cultivos celulares. Asimismo, reportaron una continuidad de infección del virus, es decir, que el virus podía pasar de un linaje celular a otro a través de exosomas infecciosos. Con base a los datos recolectados, proponen un mecanismo teórico de como la garrapata transmite LGTV en un huésped, (figura 6). En un inicio, los exosomas derivados de garrapata que contienen material infeccioso de LGTV se internalizan en keratinocitos, o células endoteliales (que es donde ocurre el primer contacto de los exosomas con el hospedero por la picadura de garrapata), liberan el contenido viral en la célula sana, y posteriormente el material genómico viral utiliza la maquinaria de la célula para replicarse y producir tanto nuevos exosomas infectados, como nuevos viriones, que se liberan en el torrente sanguíneo, se diseminan a través del torrente circulatorio, hasta llegar directamente a la barrera hematoencefálica (BHE). Los exosomas infectados tienen mayor probabilidad de hacer contacto con las células de la BHE, cuando ocurre el contacto, estos se internalizan llevándose a cabo la replicación viral, donde se producen nuevos exosomas infectados que posteriormente liberan las células de la BHE. Finalmente, los exosomas infectados pueden llegar e infectar al sistema nervioso central (SNC).

En otro estudio, Zhou y cols., (2019) demuestran que el ZIKV puede infectar células neuronales corticales. Las células neuronales corticales producían exosomas capaces de infectar neuronas corticales naïve (Figura 6). Además, observaron que la producción

de exosomas dependía de la esfingomielinasa o esfingomielina fosfodiesterasa (SMPD3); observaron que ZIKV provocaba un aumento en la actividad enzimática de SMPD3, lo cual a su vez favorecía la aparición de exosomas, y, por otro lado, cuando el gen *smgd3* era silenciado de células neuronales corticales se mostraba una reducción en la carga viral de ZIKV, mostrando una estrecha relación de la SPMD3 con la producción de exosomas. Finalmente, observaron que en presencia de un inhibidor (GW4869) de SMPD3, la carga viral de ZIKV fue más baja con respecto al grupo con ausencia del inhibidor. Esto les permitió proponer que la producción de exosomas puede ser un blanco terapéutico para las infecciones virales de otros *Flavivirus*.

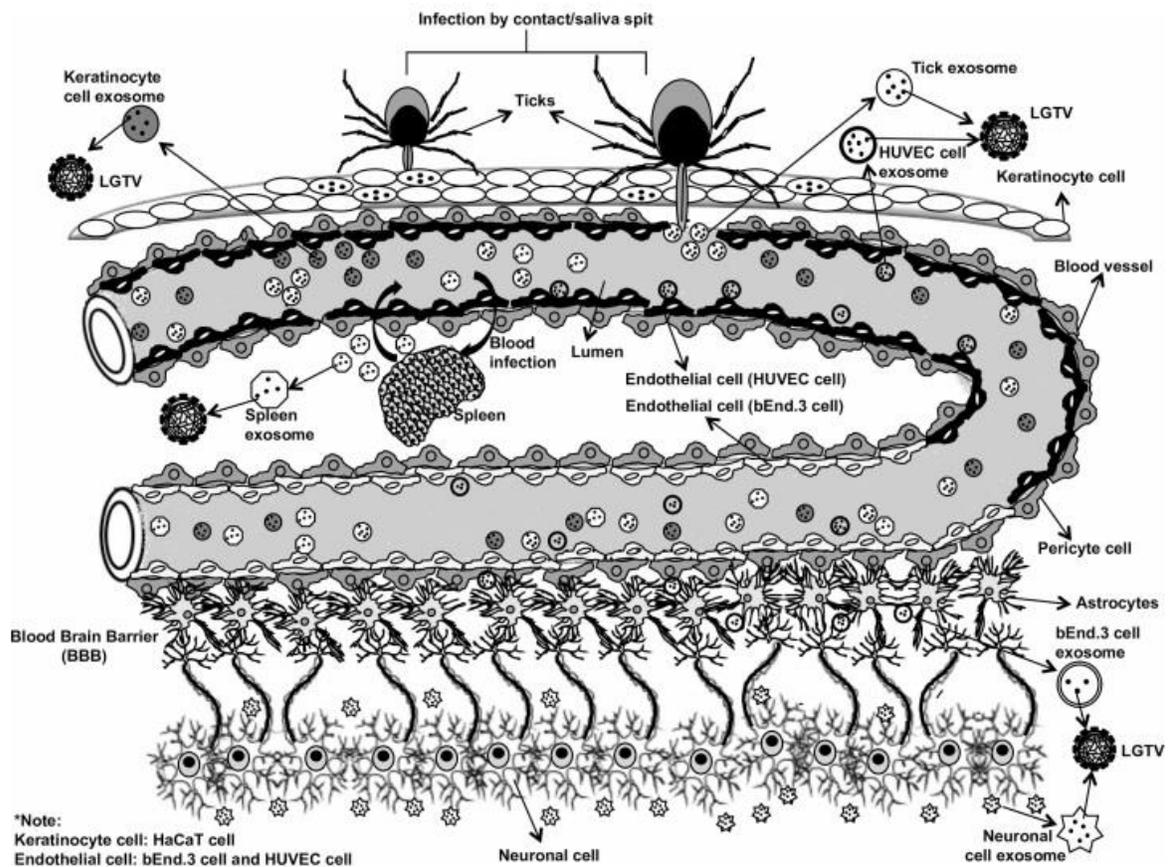


Figura 6. Esquema de la transmisión de LGTV mediado por exosomas de garrapata. Tomado de Zhou y cols. (2018). PLOS Pathogens. 14(1). e1006764.

En un estudio reciente llevado a cabo por Martínez-Rojas y col. (2020), se reportó que exosomas liberados de células de mosquito (C6/36) infectadas con ZIKV, contienen componentes virales como la Proteína E y ARN viral. Se observó que los exosomas contenían ARN de ZIKV, los cuales mostraron capacidad de infectar células de mosquito C6/36. Asimismo, la capacidad infectiva de los exosomas derivados de células de mosquito infectadas por ZIKV también se observó en células de mamífero, tanto en monocitos como en células endoteliales. Los exosomas infectados con ZIKV pueden infectar otras líneas celulares como células de la BHE e incluso del SNC (Zhou y cols., 2019).

***Flavivirus* neurotrópicos**

Los *Flavivirus* como TBEV, WNV (virus del Nilo occidental), JEV (virus de la encefalitis japonesa), YFV (virus de la fiebre amarilla), ESLV (Virus de la encefalitis de St. Louis), DENV y ZIKV son importantes patógenos neurotrópicos humanos, que en su mayoría causan daño severo en el SNC. Esto se debe a que estos virus inducen neuro inflamación desarrollando cuadros de encefalitis, infiltrados de células inmunológicas, activación de la microglía y degeneración neuronal (Maximova y col., 2009; Tsunoda y col., 2016). Como el SNC está conectado a la BHE, la relación de los *Flavivirus* con la barrera hematoencefálica es sumamente importante (Zhou y cols., 2018, 2019).

Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura especializada que funciona como barrera tanto física como química debido a que es altamente selectiva y poco permeable, y esta se encarga de regular el intercambio de moléculas entre el torrente sanguíneo y el parénquima cerebral (figura 7). El desarrollo y mantenimiento de la barrera está regulado

tanto por elementos celulares como no celulares que interactúan con las células endoteliales de la microvasculatura cerebral. La BHE está constituida por células endoteliales, pericitos, astrocitos que con sus pies perivascuales rodean más del 90% del capilar sanguíneo, y de forma muy cercana, la microglia. Además, existen componentes no celulares como los de la matriz extracelular (MEC) que son todos los componentes de la matriz intersticial y de la membrana basal; mientras que la membrana basal está prácticamente compuesta de colágeno de tipo IV, laminina y fibronectina (Obermeier y cols., 2013).

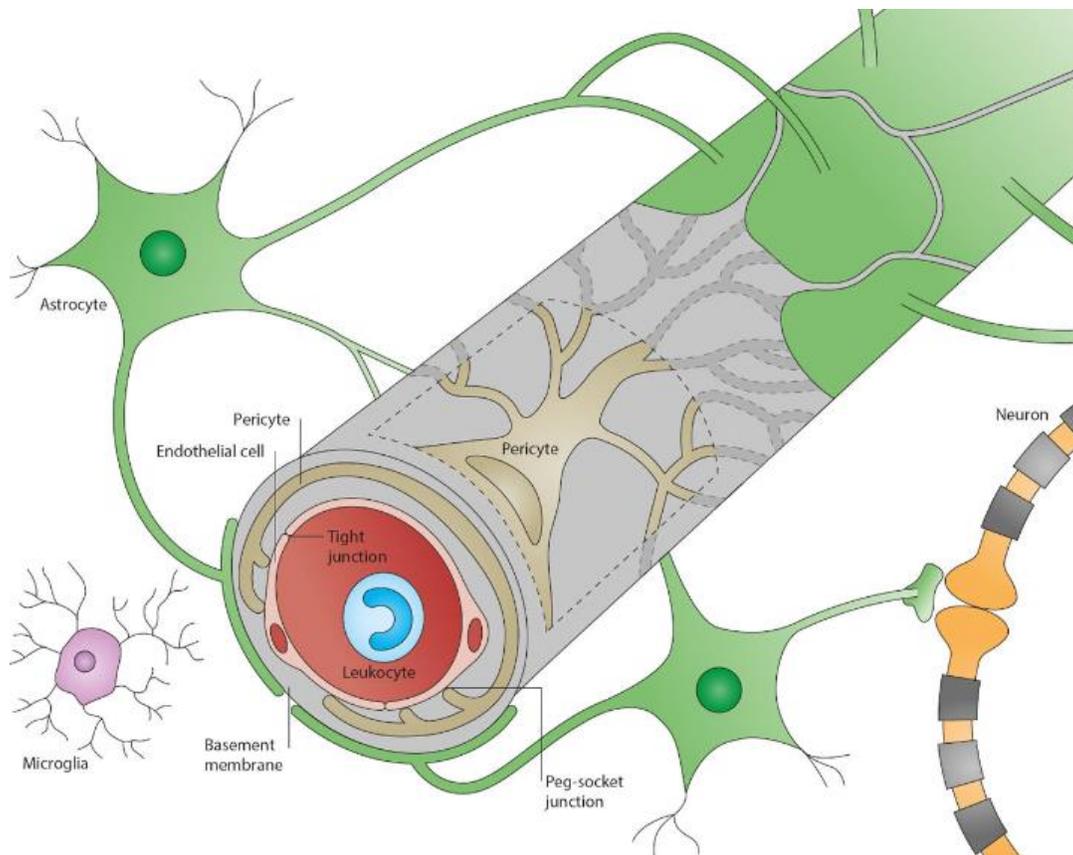


Figura 7. Estructura de la barrera hematoencefálica (BHE). Tomado de Obermeier y cols., 2013 *NatMed* doi:10.1038/nm.3407.

Las células endoteliales de la BHE son únicas, ya que carecen de fenestraciones, el paso por transocitosis es extremadamente bajo y, se encuentran unidas entre sí por diversas proteínas, entre las que se encuentran las que conforman las uniones estrechas u ocluyentes (Tight junctions proteins, TJP) que impiden el paso de moléculas de manera paracelular. Las TJP presentes son de la familia de las claudinas (principalmente cldn-5) y la ocludina; que interaccionan con las proteínas de andamiaje del citoesqueleto llamadas Zónula ocludens, principalmente la primera (ZO-1). Por otro lado, los pericitos se encargan del mantenimiento vascular y de la correcta formación de las uniones ocluyentes con ayuda de las TJP, mantienen un nivel de transocitosis bajo y reducen la expresión de moléculas de adhesión para leucocitos. Finalmente, los astrocitos se encargan de la regulación del paso de iones, el reciclamiento o aclaramiento de los neurotransmisores, controlan la respuesta inmune local, y mejoran la permeabilidad de la barrera favoreciendo la expresión de las TJP (Greene & Campbell, 2016; Obermeier y cols., 2013).

Barrera hematoencefálica y neuro inflamación

Se reportaba que el cerebro era inmunológicamente privilegiado en parte por la BHE, sin embargo, actualmente se conoce que también interactúan componentes del sistema inmunitario a través de la BHE y el SNC. Las citocinas juegan un papel importante en la inflamación del SNC ó neuro inflamación. Los mediadores inflamatorios más comunes son: IL1 β , IL6, TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y proteasas. El TNF α de manera normal promueve un efecto neuro protector y neurotrófico de las células del SNC, sin embargo, la presencia de citocinas de forma prolongada favorece el proceso inflamatorio. Por otro lado, existen citocinas que afectan

directa o indirectamente al SNC (mediante sus receptores y la señalización que desencadenan), favoreciendo una neurodegeneración, que puede mantenerse en un estado constante por una retroalimentación positiva de las citocinas (Banks & Erickson, 2010; Kempuraj y cols., 2016).

El mecanismo por el cual se establece la neuro inflamación es complejo, pero se sabe que la concentración de citocinas proinflamatorias juega un papel importante en este mecanismo. Se han descrito cinco posibles mecanismos mediante los cuales las concentraciones de citocinas se pueden incrementar en el SNC, resultando en un cuadro neuro inflamatorio: 1) estimulación vagal o por otro nervio aferente, 2) liberadas por células del sistema inmune, 3) estimulación por órganos, 4) pase directo y 5) liberación auto estimulada por el propio SNC activado (Kempuraj y cols., 2016).

Por otro lado, la BHE es una estructura que está en contacto con componentes inmunológicos que forman la unidad neurovascular (NVU), entre ellos los astrocitos, que expresan de manera natural la proteína acida fibrilar glial (GFAP), que mantiene una BHE funcional, de forma normal, entre otras funciones. Sin embargo, esta proteína afecta su expresión positivamente cuando los astrocitos son activados, con lo que eleva su expresión en procesos de neuro inflamación, debido a este fenómeno esta proteína se usa como un marcador de activación glial (Middeldorp & Hol, 2011; Yang & Wang, 2015).

Barrera hematoencefálica en infección por ZIKV

El ZIKV también se ha encontrado a nivel del SNC, lo cual indica que atraviesa la BHE. En un estudio reciente, se utilizaron dos cepas virales de linaje diferente (africano y asiático) para evaluar su citotoxicidad en células de la microvasculatura cerebral de

cerebro humano, observando que ambas células producían citocinas proinflamatorias, principalmente IL6, lo cual ayuda a reclutar y activar otras células. En este estudio, el ZIKV no alteró la permeabilidad de la BHE en cultivos celulares, lo cual sugiere que el virus pasa a través de algún mecanismo de transcitosis (Papa y cols., 2017). Por otro lado, se ha demostrado que el ZIKV puede utilizar los exosomas como mediadores de la transmisión viral entre las neuronas, aumenta la expresión de SMPD-3 (esfingomielinasa requerida para la biogénesis de exosomas), y que los exosomas pueden transportar el contenido viral (ARN, proteína E) con capacidad de infectar a otras neuronas sanas (Mustafá y cols., 2019; Zhou y cols., 2019). Finalmente, en nuestro grupo de trabajo, se demostró que los monocitos humanos (THP-1) infectados con ZIKV son capaces de alterar la BHE (Avilez Avilez, 2020).

Con base en estas observaciones, se propuso el siguiente Planteamiento del problema:

Planteamiento del problema

El ZIKV es un *Flavivirus* emergente que puede ocasionar casos de infección asociados a enfermedades neurológicas de gravedad, tanto en adultos como en neonatos (Song y cols., 2017) La interacción entre el vector y el hospedero humano durante la infección por ZIKV aún no está totalmente esclarecido, no obstante, recientemente se ha demostrado que los exosomas liberados por células del mosquito vector (*Aedes spp*), tienen un papel importante en la interacción huésped-parásito, tal como lo demostraron Vora y cols. en 2018, proponiendo que el DENV puede diseminarse mediante exosomas, lo que también le permite evadir y/o modular la respuesta inmune del hospedero. Por otro lado, en un estudio hecho por Zhou y cols. (2018) en un modelo *in vitro*, demostraron que las VEs liberadas de células infectadas con LGTV (ISE6, línea celular de garrapata) contenían

ARN viral, que, a su vez, era capaz de infectar endotelio cerebral humano (células responsables de formar la BHE). Finalmente, Martínez-Rojas y cols. (2020), reportaron como el ZIKV puede infectar células de mosquito C6/36, las cuales producen exosomas cuyo contenido tenía ARN viral, dichos exosomas eran capaces de infectar células sanas, como monocitos y células del endotelio vascular humano.

El ZIKV es un virus neurotrópico que puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Papa y cols., 2017), sin embargo, los mecanismos involucrados en la permeabilidad de la barrera y la etiopatogenia del ZIKV en el SNC no están completamente dilucidados. Aunque, en nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que los exosomas liberados por monocitos humanos (THP-1) infectados con ZIKV alteran la BHE y desencadenan una respuesta inflamatoria a nivel de SNC *in vivo* (Avilez-Avilez, 2020). La relación que existe entre las VEs y la infección viral últimamente ha despertado el interés de los investigadores. Con respecto a ZIKV, hay una relación en la patogenia con la participación de exosomas como se mencionó anteriormente; sin embargo, hasta el momento se desconoce la relación que existe entre los exosomas liberados por células C6/36 (células del mosquito vector) con respecto a la BHE. Por lo tanto, planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis

Los exosomas provenientes de células C6/36 (células del mosquito vector) infectadas con ZIKV pueden provocar un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en ratones BALB/c.

Objetivo General

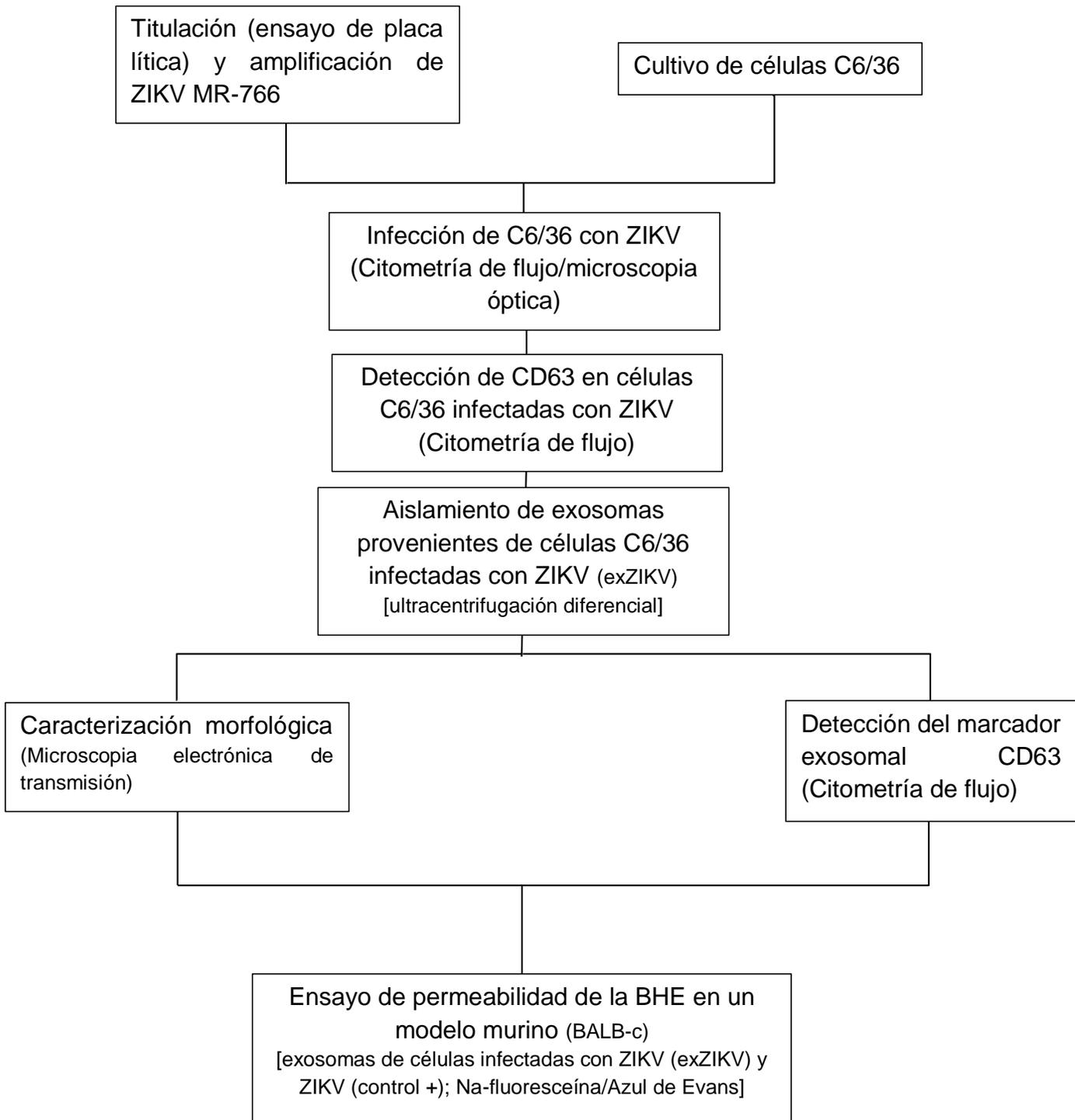
Estudiar la participación de exosomas liberados de células C6/36 infectados con ZIKV (exZIKV) en la permeabilidad de la BHE, en ratones macho BALB/c, identificando si producen alguna alteración en la barrera.

Objetivos particulares

1. Conocer el título del stock viral (previamente amplificado) por medio de un ensayo de placa lítica en células Vero.
2. Los cambios morfológicos inducidos por ZIKV se evalúan por microscopia de campo claro para determinar las condiciones óptimas de infección en células C6/36.
3. Detectar la presencia de la proteína E viral de ZIKV por citometría de flujo (CF) para determinar las condiciones óptimas de infección en células C6/36. Las condiciones óptimas permitirán una mayor recuperación de células C6/36 infectadas con ZIKV.
4. Evaluar la presencia de una proteína homóloga a la tetraspanina CD63 humana (marcador exosomal), en la superficie de células C6/36, para determinar la mejor condición con un mayor rendimiento en el aislamiento de exosomas.
5. Obtener exosomas purificados provenientes de células C6/36 naïve o infectadas por ZIKV (exZIKV) mediante ultracentrifugación diferencial.
6. Detectar la presencia de exosomas obtenidos por ultracentrifugación diferencial mediante la detección de la proteína homóloga a CD63 humana en células C6/36 por CF.
7. Evaluar la morfología de exosomas liberados de células C6/36 mediante caracterización por microscopia electrónica de transmisión (TEM²).

8. Estandarizar las condiciones de infección por ZIKV en un modelo murino de ratones macho BALB/c mediante ensayos de permeabilidad de la BHE con los trazadores Na-fluoresceína y azul de Evans, mediante la detección de fluorescencia.
9. Conocer el efecto que exosomas liberados de células C6/36 infectadas con ZIKV, tienen sobre la permeabilidad de la BHE en un modelo murino de ratones macho BALB/c, con los trazadores Na-fluoresceína y azul de Evans, mediante la detección de fluorescencia.

Diseño experimental



Materiales y métodos

Líneas celulares y virus

Se utilizaron células epiteliales de riñón de mono (Vero ATCC CCL-81) y células de lisado de larva (C6/36, ATCC CRL-1660) de mosquito *Aedes albopictus*. Las células Vero se mantuvieron en medio DMEM (Biowest) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 5%, L-glutamina al 1% (200mM, Biowest), 1% de solución de antibióticos (10,000U/mL de penicilina, 10mg/mL de estreptomina y 25µg/mL de anfotericina B, Biological Industries) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ (Incubador Series 8000 WJ CO₂, Thermo Fisher Cientific). Las células C6/36 se mantuvieron en medio L-15 (Biowest), suplementado con SFB al 10%, triptosa fosfato al 1% (Difco), L-glutamina al 1%, solución de antibióticos al 1% y se incubaron a 28 °C acondicionado en condiciones mínimas de CO₂. Se utilizó la cepa de ZIKV *Macacus rhesus* (MR) 766.

Titulación viral por ensayo de placa lítica

En la titulación viral se usaron monocapas confluentes de células Vero, incubadas en placas de cultivo de 24 pozos (Corning) con medio DMEM (suplementado con SFB al 5%, 1% de L-glutamina y 1% de antibióticos) a 37°C y 5% de CO₂. Se hicieron diluciones seriadas de 1:10 de un stock viral concentrado de ZIKV con medio DMEM no suplementado. Con una confluencia del 90% las células se infectaron con 0.4mL de las alícuotas de ZIKV, obteniendo un factor de dilución entre cada pozo de 10⁻¹ hasta 10⁻²²; las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ por dos horas. El inóculo viral se retiró de cada pozo y se hizo un lavado con PBS 1x (pH 7.4), posteriormente los pozos fueron cubiertos con 1mL de medio DMEM suplementado al 2.5% de SFB con 1% de metilcelulosa, e incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ hasta observar formación de placas

en los pozos (14 días). Posteriormente, las células se fijaron con metanol al 96% por 15 min y se tiñeron con cristal violeta al 1%. El título viral se expresó en Unidades Formadoras de Placa por mL (UFP/mL) y se calculó con la siguiente fórmula:

$$UFP/mL = \frac{n}{(V \times FD)}$$

En donde, n corresponde al promedio del número de placas contadas, V al volumen de la dilución colocado en el pozo y FD a la dilución en que se contaron las placas.

Amplificación de ZIKV en células C6/36

Cultivos celulares confluentes de células C6/36 se inocularon con 20 μ L de stock de ZIKV (8×10^9 UFP/mL) con medio L15 suplementado en cajas de cultivo F25 (Nest) y se incubaron a 28 °C con condiciones mínimas de CO₂ durante 2h. Transcurrido el tiempo se retiró el inóculo y se agregó medio L15 suplementado (SFB al 10%, 1% de triptosa fosfato, 1% de L-glutamina y 1% de antibióticos), y los cultivos celulares se incubaron a 28 °C con condiciones mínimas de CO₂ hasta observar el mayor efecto citopático aproximadamente en el 90% del cultivo. Los cambios en la morfología de las células se evaluaron mediante microscopía óptica (Olympus IX71), se obtuvo la cosecha viral mediante el desprendimiento de la monocapa celular, mediante choque térmico por congelación-descongelación a 4°C, llevado a cabo tres veces. Se prepararon alícuotas virales de 500 μ L y se almacenaron a -70°C (REVCO ULT1786) hasta su uso posterior.

Infección de células C6/36 con ZIKV

Para determinar las mejores condiciones en las que el ZIKV infecta a células C6/36, se llevó a cabo una cinética de infección a las 24, 48 y 72 horas, se pusieron 5×10^5 células por pozo (en una placa de 12 pozos), con 3 mL de medio L-15 suplementado. Al llegar a una confluencia del 90%, las células se infectaron con ZIKV a diferentes MOI (1, 3 y 5), se dejaron dos horas de adsorción acondicionado en niveles mínimos de CO_2 . Posteriormente, se retiró el inóculo viral y se adicionaron 3 mL de medio L-15 suplementado, se incubaron las células acondicionadas a niveles mínimos de CO_2 , durante 24, 48 y 72h PI. Se realizó un lavado con PBS 1X al término de cada periodo PI, después las células se resuspendieron por pipeteo con medio L-15 suplementado, se homogenizaron y se traspasaron a microtubos de 1.5mL (Labcon), para su uso posterior. Se trató un cultivo celular como control negativo, el cual fue sometido a las mismas condiciones que las células infectadas.

Determinación de la proteína E de células infectadas por ZIKV mediante Citometría de Flujo

Las células C6/36 transferidas en los microtubos de 1.5mL se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5415 R) para retirar el medio de cultivo a 6400 rpm por 10 min a una temperatura aproximada de 28°C y el pellet celular se lavó con PBS 1X; se fijó con paraformaldehído al 2% (Sigma) por 5 min a 4°C y se lavó con PBS 1X. Posteriormente, las células se incubaron a temperatura ambiente con albúmina sérica bovina (BSA, Biowest) al 2% para el bloqueo de sitios inespecíficos, por un periodo de 30 minutos, se lavaron con BSA al 0.5% y se incubaron con un anticuerpo primario proveniente de ratón

anti-ZIKV (Catálogo #CABT-B8528, CD Creative Diagnostics, New York, NY, USA) a una dilución 1:300 en BSA al 0.5% en frío y agitación constante de 1000 rpm por toda la noche. Al terminar el periodo establecido, las células se lavaron con BSA al 0.5% y se incubaron con un anticuerpo policlonal secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa 555 (Catálogo #A-31570, Thermo Fisher Scientific) en una dilución 1:500 en BSA al 0.5%, a temperatura ambiente con agitación constante de 1000 rpm y protegidos de la luz. Los pellets resultantes se lavaron con BSA al 0.5% y se pasaron a tubos para citómetro donde se analizaron con el equipo FACSCalibur y los datos generados se analizaron con ayuda del programa FlowJo V10. Este experimento fue llevado a cabo por triplicado.

Determinación de la tetraspanina CD63 en células C6/36 infectadas con ZIKV

Como se mencionó anteriormente, existe una TSP en el mosquito que es esencial para la formación de exosomas, la cual es una proteína homóloga a CD63 humana (Ahmed y cols., 2021). Por lo que, para evaluar la presencia de CD63 (en células infectadas con ZIKV) en la superficie de las membranas celulares, se llevó a cabo una cinética de infección considerando la dosis óptima de infección (MOI 1) a tiempos de 24, 48 y 72h PI con dos controles negativos, uno con células tratadas en las mismas condiciones que las células infectadas, el cual será mencionado como **mock** y otro con células sin anticuerpo el cual será mencionado como **control negativo**. Las células se resuspendieron con medio L15 suplementado, se homogenizaron por pipeteo y se traspasaron a microtubos de 1.5mL, para retirar el medio de cultivo se centrifugaron a 6400 rpm por 10 min a una temperatura de 28°C, y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, las muestras se fijaron y bloquearon los sitios inespecíficos, tal como se hizo para la determinación de la proteína E viral. Las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD63

humano (Catálogo #557305, BD Pharmingen) en una dilución 1:20 al 0.2% de BSA, por una hora a temperatura ambiente con una agitación constante de 1000 rpm y protegidos de la luz. Los pellets resultantes se lavaron con BSA al 0.2% y se pasaron a tubos para citómetro para su análisis en el equipo FACSCalibur. Los datos generados se analizaron con ayuda del programa FlowJo V10. Este experimento fue realizado por triplicado.

Preparación de Suero Fetal Bovino reducido en exosomas

El suero fetal bovino (SFB de Gibco) se puso en tubos cónicos (Corning) y se llevó a cabo una centrifugación diferencial, utilizando la ultracentrífuga Beckman XL-90, rotor SW-28, a una velocidad constante de 25,000rpm por un periodo de 18h, según lo establecen los protocolos de la ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) (Théry y cols., 2018). Posteriormente se recolectó el sobrenadante, y se hicieron alícuotas que se almacenaron a 2°C para su uso posterior.

Aislamiento de VEs provenientes de células infectadas con ZIKV, mediante ultracentrifugación diferencial

Células C6/36 confluentes en cajas F75 se infectaron con ZIKV a una MOI de 1, se dejaron a un tiempo de adsorción de 2h a 28°C acondicionadas a niveles mínimos de CO₂, al pasar ese periodo se retiró el inóculo viral y se adicionó medio L15 suplementado al 10% con SFB reducido en exosomas, se volvieron a incubar a 28°C. Al pasar 72h PI, se recolectaron las células en tubos cónicos de 50mL (Nest). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a una velocidad inicial a 1900 rpm por 10 min, posteriormente se centrifugaron a 3,500 rpm por otros 10 min, se recolectó el sobrenadante y se colocó en los tubos para ultracentrífuga. Las muestras se colocaron en el rotor SW28 en la ultracentrífuga, la cual se programó a una velocidad de 7000 rpm por 35 min.

Posteriormente, el sobrenadante se recolectó en tubos para ultracentrífuga y las muestras se centrifugaron a 24,800 rpm por 70 min. Se desechó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió con mucho cuidado utilizando PBS 1X y se filtró con papel Whatman con poro de 0.22 μ m al vacío, se recolectó el líquido resultante del fondo del matraz. Se pasó el contenido del matraz a tubos para ultracentrífuga y se centrifugó a una velocidad de 24,800 rpm durante 70 min. Al finalizar esta centrifugación, se procedió a coleccionar el pellet utilizando PBS 1X. Se hicieron alícuotas y se conservaron a -70°C hasta su uso posterior. Por otro lado, se utilizó un cultivo mock como control (un cultivo celular no infectado se trató del mismo modo que las células infectadas).

Detección de exosomas CD63⁺ provenientes de células C6/36 infectadas con ZIKV mediante acoplamiento a perlas paramagnéticas

Se evaluó la presencia de exosomas provenientes de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV) mediante el acoplamiento de exZIKV a perlas paramagnéticas que reconocen a CD63 (Tetraspanina presente en exosomas), mediante citometría de flujo. Se resuspendieron las perlas paramagnéticas durante 30s en vortex, se adicionó una cantidad equivalente a 60 μ l en microtubos de fondo redondo que contenían 200 μ l de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5%. Se colocaron las perlas en un magneto durante 1 min, y se retiró el sobrenadante por pipeteo; posteriormente se adicionaron 100 μ l de la muestra, ya sea alícuota de exZIKV o muestra Mock. Posteriormente, se mezcló cada alícuota con las perlas, y las muestras se dejaron incubando a 4°C y 1000 rpm por 18h. Las muestras se lavaron dos veces, la primera con 300 μ l de BSA al 0.5%. y la segunda con 400 μ l de BSA al 0.5%. Una vez lavadas, a las muestras se les añadió 100 μ l de anticuerpo anti CD63-PE humano (en una dilución 1:20 en BSA al 0.5%), y se dejaron

incubando a temperatura ambiente durante 1h protegidas de la luz. Las muestras se transfirieron a tubos para citómetro y se analizaron en el FACSCalibur con el lector Picoeritrina (PE). Los datos generados fueron analizados utilizando el software FlowJo V.10.

Caracterización de los exosomas de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV) mediante microscopia electrónica de transmisión

Cultivos de células C6/36 en cajas de cultivo F75 sin estímulo (mock) e infectadas con ZIKV (MOI 1 72h) se prepararon para el aislamiento de exosomas y posterior caracterización por microscopia electrónica de transmisión (TEM²), una vez que las células se recolectaron, se centrifugaron y el pellet se fijó en una relación 1:1 con glutaraldehído al 2.5% (EMS) y paraformaldehído al 4% (Sigma) por 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron lavados con PBS 1X. Posteriormente las células se incubaron con tetraóxido de osmio al 2% durante 90 minutos a temperatura ambiente. El pellet se lavó con PBS 1X y se deshidrató con soluciones concentradas de etanol de manera ascendente (30, 50, 70, 80, 90 y 96%). Se efectuaron tres pases en etanol absoluto (de 5 min cada uno) y posteriormente tres pases en óxido de propileno a temperatura ambiente. El pellet se colocó en una mezcla relación 1:1 de óxido de propileno/resina epóxica durante 18 h, al terminar el tiempo de incubación, las células se fijaron en resina epóxica pura a 60°C durante 48 h, después se hicieron microcortes de 40-50nm utilizando un ultramicrotomo (Leica EM UC7, Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA). Las muestras se montaron en rejillas de cobre y se cubrieron con formvar. Para contrastar las muestras se utilizó primero acetato de uranilo por 30 min, y posteriormente citrato de plomo por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se observaron mediante un microscópico electrónico de transmisión (JEM1010 model; JEOL, Peabody, MA, USA)

que opera a 80kV, se tomaron fotos correspondientes con una cámara especializada adaptada al microscopio (CCD300-RC) y las imágenes resultantes se analizaron utilizando el software ImageJ.

Determinación de proteína de exZIKV mediante BCA

La concentración de proteínas que contenían las muestras de exZIKV, se evaluó utilizando el kit Micro BCA Protein Assay kit (método del ácido bicinconínico). Las soluciones se prepararon según las instrucciones del proveedor (Thermo-Fischer-Scientific) y se pusieron por separado en tubos cónicos de 15mL (Nest) protegidos de la luz. Por otro lado, se preparó una solución de albúmina de 5mg/mL, para hacer una curva de calibración de proteína, la cual se hizo diluyendo con PBS 1X (1:10) la solución de albúmina y posteriormente se hicieron diluciones seriadas 1:2 en PBS 1X en pozos de placa con fondo plano (Nest). Se tomaron alícuotas de 30 μ L del aislamiento de exosomas (tanto mock como exZIKV), y se diluyeron en una relación 1:10 en PBS 1X, se agregaron las soluciones del kit previamente preparadas hasta alcanzar un volumen final de 300 μ L. Se agregaron 100 μ L de muestra en cada pozo y se incubaron las muestras a 60°C durante una 1h, posteriormente se midió la absorbancia de las muestras con ayuda de un espectrofotómetro (Multiskan Ascent spectrophotometer Thermo Labsystems) a una longitud de onda de 562nm, utilizando el software Ascent versión 2.6. La concentración de proteína de cada muestra se estimó a partir la curva de calibración previamente descrita. La medición de la absorbancia se llevó a cabo por triplicado.

Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la infección por ZIKV en un modelo murino

Los ensayos de permeabilidad se realizaron en ratones macho BALB/c de 20-25g de peso, de 2-3 semanas (Unidad de Manejo de Modelos Biológicos, IIB, UNAM). Las dosis de ZIKV (1.0×10^3 y 1.0×10^5 UFP) se administraron vía IP, esta ruta de administración es la más sencilla de aplicar, además de que distribuye el ZIKV de manera homogénea en el ratón, a diferencia de la vía intracerebral donde la infección simplemente se asienta en el SNC (Musso & Gubler, 2016). La selección de las dosis virales estuvo sujeta a los criterios de Aubry y cols., (2021), donde al realizar cinéticas de infección para una cepa de linaje africano (MR766), observan que hay cargas virales desde dosis de 1.0×10^3 UFP hasta tener un pico máximo pasadas 72h PI, en ratones AG129. Por lo tanto, para evaluar la cinética de infección por ZIKV en ratones BALB/c y porque en un modelo *in vivo* no puede establecerse una MOI determinada, se siguió con las dosis y tiempos antes descritos. Por lo tanto, los ratones se inocularon por vía IP con 10^3 o 10^5 UFP de ZIKV, en un volumen final de 200 μ L (PBS 1x), a las 24 y 48 horas PI. Los experimentos se hicieron por triplicado (con una n=3 para cada condición), como control negativo se utilizaron ratones no expuestos al virus.

La evaluación de la permeabilidad de la BHE se hizo siguiendo la metodología propuesta por Gómez-González y cols., (2013), donde al concluir los periodos de tiempo antes mencionados se realizó la siguiente metodología: los ratones fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico y se les administró 100 μ L de una solución de Azul de Evans (1mg/mL, SIGMA E2129-10G) con Na-Fluoresceína (10mg/mL SIGMA F6377-100G) vía intracardiaca por tres minutos. Gómez-González y cols. (2013) detallan

que el azul de Evans (AE) es un trazador que, al alcanzar la circulación sanguínea, se conjuga con la albúmina sérica y forma compuestos estables de alto peso molecular, y al atravesar la BHE, puede indicar un aumento en el transporte de proteínas del torrente sanguíneo hacia el SNC, aunque no siempre es el caso, ya que Saunders y cols., (2015) mencionan que el azul de Evans es un trazador que puede unirse a componentes celulares e incluso ser capturado por ciertos linajes celulares como astrocitos, por lo que, decidimos utilizar otro trazador, para evaluar en conjunto el daño a la integridad de la BHE, el Na-F. El Na-F es un trazador fluorescente más pequeño que sirve para detectar el paso de moléculas más pequeñas, ya que se ha demostrado que es estable, y no forma conjugados con proteínas séricas, pero menos permeables, a través de la BHE (Saunders y cols., 2015). En este estudio, los trazadores fueron administrados intracardiamente según lo aborda Nag, (2003) porque a través de esta vía se asegura una distribución rápida y homogénea de las sustancias en el cerebro del ratón y para detectar la mínima alteración de la permeabilidad a la BHE

Posterior a la administración de los trazadores, se perfunde a los animales con solución salina isotónica (0.9% NaCl) durante tres minutos, ya que como abordan Saunders y cols., (2015) el azul de Evans puede quedar remanente en los capilares que tienen contacto con la BHE, por lo tanto, la perfusión ayuda a retirar el excedente de colorante.

Una vez obtenidos los cerebros, se extrajeron las regiones cerebrales: cerebelo, corteza cerebral y áreas subcorticales (ganglios basales e hipocampo), y las muestras cerebrales se depositaron en microtubos de 1.5mL. Para este estudio, la selección de las áreas del cerebro para la evaluación de la permeabilidad de la BHE luego del estímulo con ZIKV y

exosomas de células C6/36 infectadas, se basó en el reconocimiento de la BHE como una estructura dinámica a través del cerebro y de que existen regiones cerebrales desprovistas de ésta, como los órganos circunventriculares (Escobar & González, 2008), las cuales fueron descartadas. Por otro lado, se ha descrito que el ZIKV atrofia las regiones corticales y subcorticales e induce la malformación de estructuras cerebrales como el vermis cerebeloso en fetos y recién nacidos diagnosticados con SCZ (Torres, 2017). Por este motivo se decidió evaluar cerebelo, corteza cerebral y regiones subcorticales.

Las muestras se homogenizaron con PBS 1X (400 μ L) y posteriormente se centrifugaron a 13500rpm/10min a 4°C; se descartó el pellet, y al sobrenadante se le adicionó metanol (400 μ L), y se centrifugó en las mismas condiciones previamente descritas. Finalmente, se agregaron 100 μ L (por triplicado) de sobrenadante de cada muestra cerebral en microplacas de 96 pocillos de fondo plano, y se evaluó mediante determinación de fluorescencia; donde Na-Fluoresceína (Na-F) emite a 535nm, y el azul de Evans emite a 595 nm. Para determinar la cantidad de trazador en las muestras, se elaboró una curva de calibración de cada trazador (Na-F o EB) de la siguiente manera: se depositaron 100 μ L de la solución de trazadores (10mg/mL Na-F, 1mg/mL EB) en el pocillo (en la microplaca de 96 pocillos de fondo plano); a partir del primer pocillo se hicieron diluciones seriadas 1:2 de la solución concentrada de trazadores, se mezcló por pipeteo y se realizó la lectura de fluorescencia como se mencionó anteriormente. La curva de calibración se elaboró para cada solución preparada de trazadores. El experimento fue realizado por triplicado.

Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un modelo murino por exZIKV

Para determinar posible participación de exZIKV en la alteración en la permeabilidad de la BHE en un modelo *in vivo*, se utilizaron ratones macho Balb/c de 20-25g de peso, inoculados vía IP con 25, 50 y 100 μ g de proteína de exZIKV a 24, 48 y 72h post inoculación; como control negativo se utilizaron ratones no expuestos al virus, con una población de $n=3$ para cada condición. Para preparar el inóculo, se hicieron alícuotas de exZIKV con las concentraciones antes descritas a un volumen final de 200 μ L con PBS 1X; posteriormente las muestras fueron irradiadas en tres ciclos consecutivos con luz UV a 1200 μ J (x100) con Stratalinker 1800 (Stratagene) para inactivar posibles partículas virales existentes en la muestra de los exosomas. El procedimiento para evaluar la permeabilidad de la BHE se llevó a cabo de la manera mencionada anteriormente para la infección con ZIKV, iniciando con la administración de una dosis letal de pentobarbital sódico, siguiendo los pasos de la metodología antes descrita hasta culminar con la lectura de los pocillos por fluorescencia. El experimento fue realizado por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos se obtuvieron a partir de ensayos hechos por triplicado. Los datos obtenidos en los ensayos de citometría de flujo fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 10.6.1. Los gráficos y el análisis estadístico de las diferencias significativas se obtuvieron gracias al software GraphPad Prism 6.0.7. Los valores fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar y evaluados con pruebas de t- de student no emparejadas.

Resultados

Titulación de ZIKV por ensayo de placa lítica

La titulación del ZIK se llevó a cabo utilizando un stock viral haciendo diluciones seriadas base 10 en medio DMEM no suplementado con 1% de metilcelulosa, hasta alcanzar una dilución final de 1×10^{-22} . La formación de placas líticas se observó a partir del día 7 post infección PI. A los 14 días PI se fijaron y tiñeron las células para contar las placas líticas. La dilución de 10^{-10} se utilizó para determinar el título viral, tomando como criterio el último pozo donde haya formación de placas líticas (flechas blancas) contables, (figura 8). Al aplicar la fórmula correspondiente, $\text{UFP/mL} = n / (V \times \text{FD})$, donde n es el promedio de placas líticas contadas en 1×10^{-10} ($n_1=22$ y $n_2=14$); V es el volumen del inóculo viral (0.4mL) y D, la última dilución en la que se observaron las placas líticas (10^{-10}).

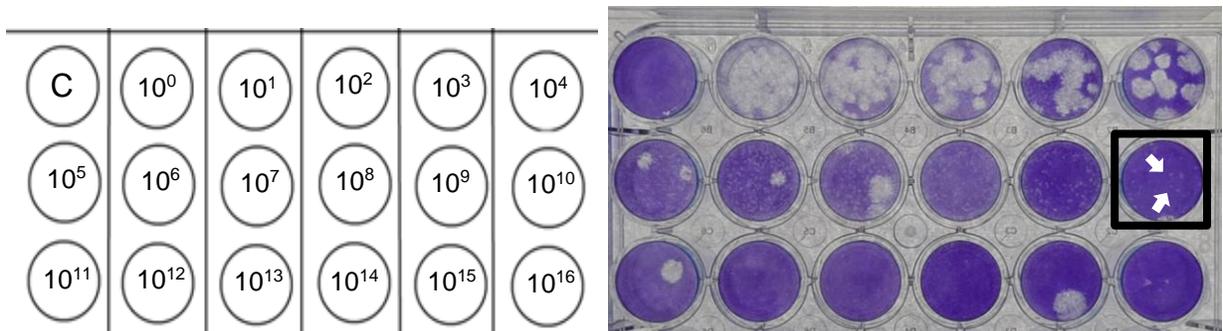


Figura 8. Titulación de ZIKV por ensayo de placa lítica

Sustituyendo los valores en la fórmula obtenemos el título viral correspondiente:

$$\text{Título viral} = \frac{18\text{UFP}}{0.45 \times 10^{-10} \text{ mL}}$$

$$\text{Título viral} = 4.0 \times 10^{11} \text{ UFP/mL}$$

Cinética de infección de células C6/36 con ZIKV mediante la detección de la proteína E viral por citometría de flujo

La cinética de infección con ZIKV en células C6/36 se llevó a cabo para determinar las condiciones de tiempo y cantidad viral en la cual se presenta el mayor efecto citopático. Se evaluaron distintas multiplicidades de infección del ZIKV (MOI 1, 3 y 5), utilizando como control negativo, células no infectadas en los diferentes tiempos post infección (PI) 24, 48 y 72h.

En los cultivos de células C6/36 control, no se observan datos de alteración morfológica, o daño celular ya que la monocapa está íntegra (figura 8), a diferencia de las células infectadas desde las 24 horas PI, en donde se observa (flechas negras) la formación de vacuolas y células gigantes tanto a una MOI=1 como MOI=5, con incremento del efecto citopático a las 48 horas con respecto a las células sin infectar. Al final de la cinética de infección a las 72 horas, se puede observar que hay desprendimiento de la monocapa celular en la MOI 5, a diferencia de la MOI 1, observándose principalmente agregados celulares (células gigantes) y formación de vacuolas. El efecto citopático antes descrito, se presentó únicamente en las células C6/36 en presencia del ZIKV.

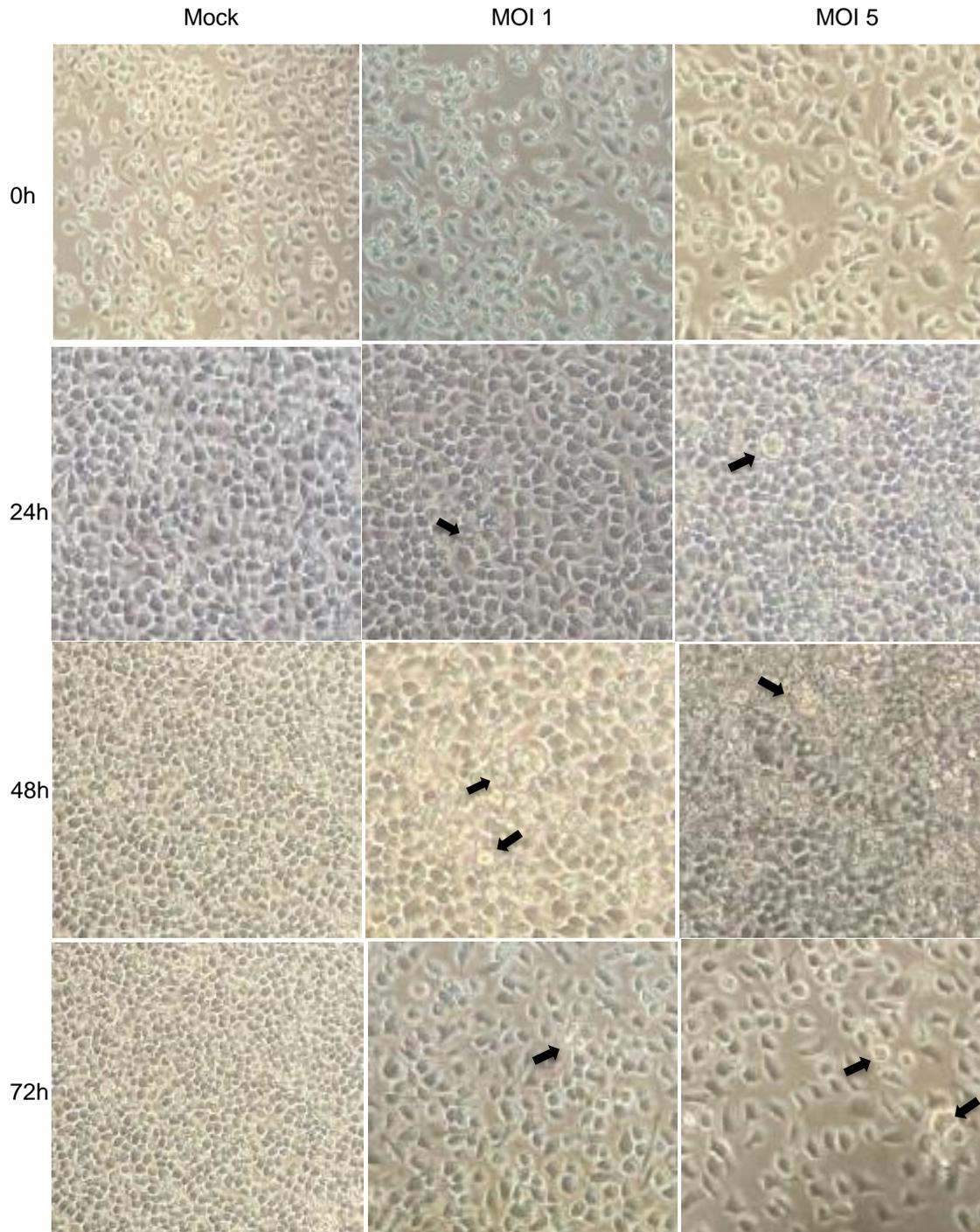


Figura 9. Células C6/36 infectadas con ZIKV por microscopia de campo claro. Se observa la morfología celular de las diferentes dosis del ZIKV con respecto al tiempo. Las flechas negras indican la presencia de cambios en la estructura celular típica (efecto citopático).

En la figura 10 se observa un incremento en el porcentaje de células infectadas con ZIKV con respecto al control, éste incremento es debido a la presencia de la proteína E. Se puede observar un incremento en la presencia de la proteína E viral, en células infectadas desde una MOI 1 a las 24h PI. Se puede observar que el control negativo tuvo una auto fluorescencia con una respuesta inespecífica de $4.75 \pm 0.22\%$, al sustraer este valor a las muestras, el mayor porcentaje de células positivas a la proteína E viral se presentó en las células infectadas con una MOI de 1 a las 48 h PI con $18.45 \pm 1.12\%$ de células positivas; el porcentaje mínimo de células C6/36 positivas a la proteína E viral fue de 6.2 ± 0.19 a una MOI de 5 a las 72h PI (figura 10).

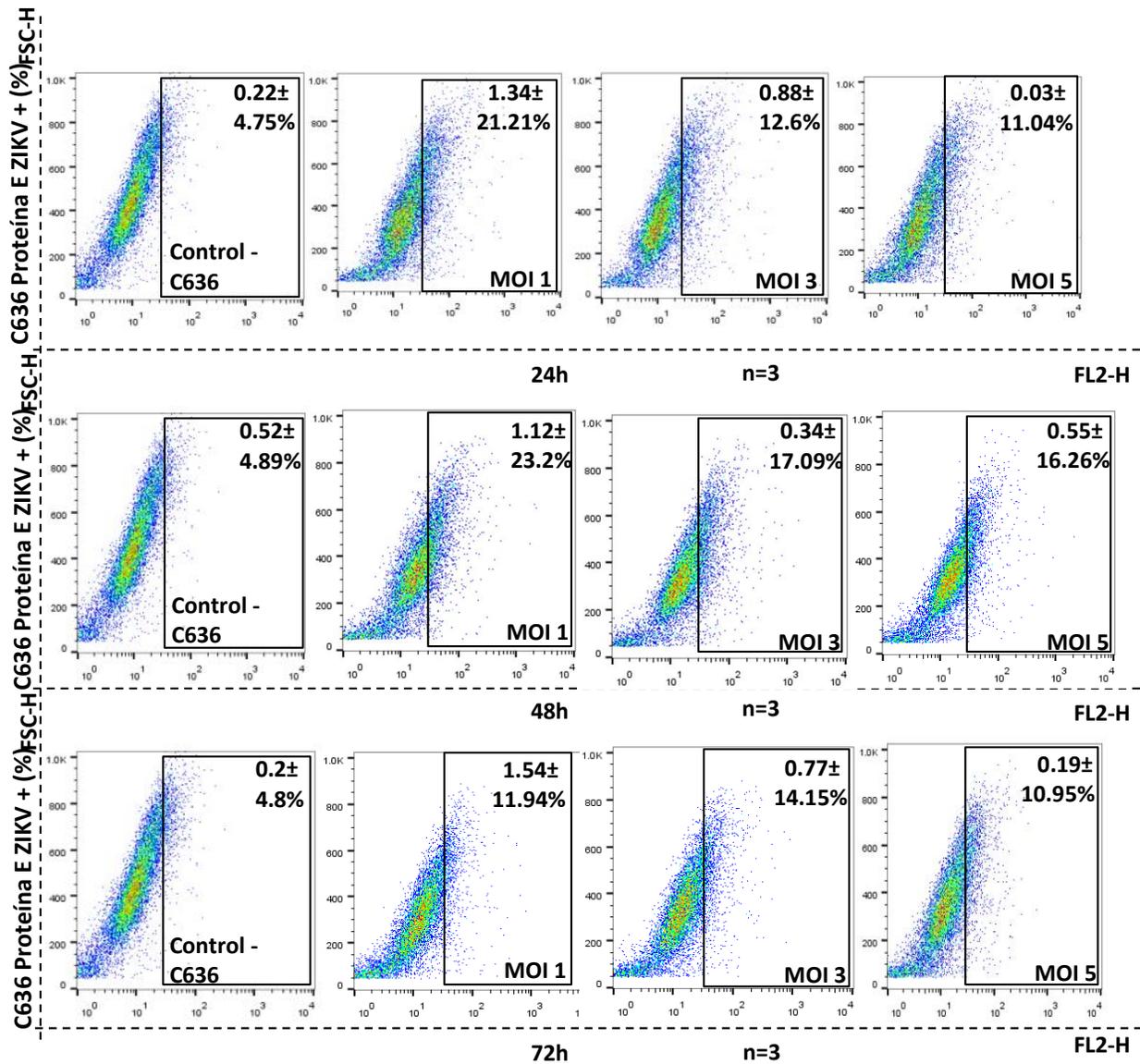


Figura 10. Detección de proteína E viral en células C6/36 infectadas con ZIKV. Se puede observar un incremento del porcentaje celular positivo a la presencia de la proteína E de ZIKV sobre la superficie celular, en diferentes condiciones (MOI 1, 3 y 5) y a distintos tiempos PI (24, 48 y 72h). Se coloca un gráfico representativo para cada condición de un experimento hecho por triplicado, donde se calcula el promedio y la desviación estándar del porcentaje de células positivas a la proteína E viral de ZIKV, se coloca la respuesta inespecífica del control negativo.

En la figura 11 se observa que en todas las condiciones evaluadas hay una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas a la proteína E viral con respecto al control negativo, que tiene una respuesta inespecífica; esta diferencia significativa se indica con asteriscos. Se puede observar que a una MOI 1 existe una diferencia significativa con respecto a las diferentes dosis evaluadas a las 24 y 48h PI con respecto a las 72h PI con una $p < 0.0001$.

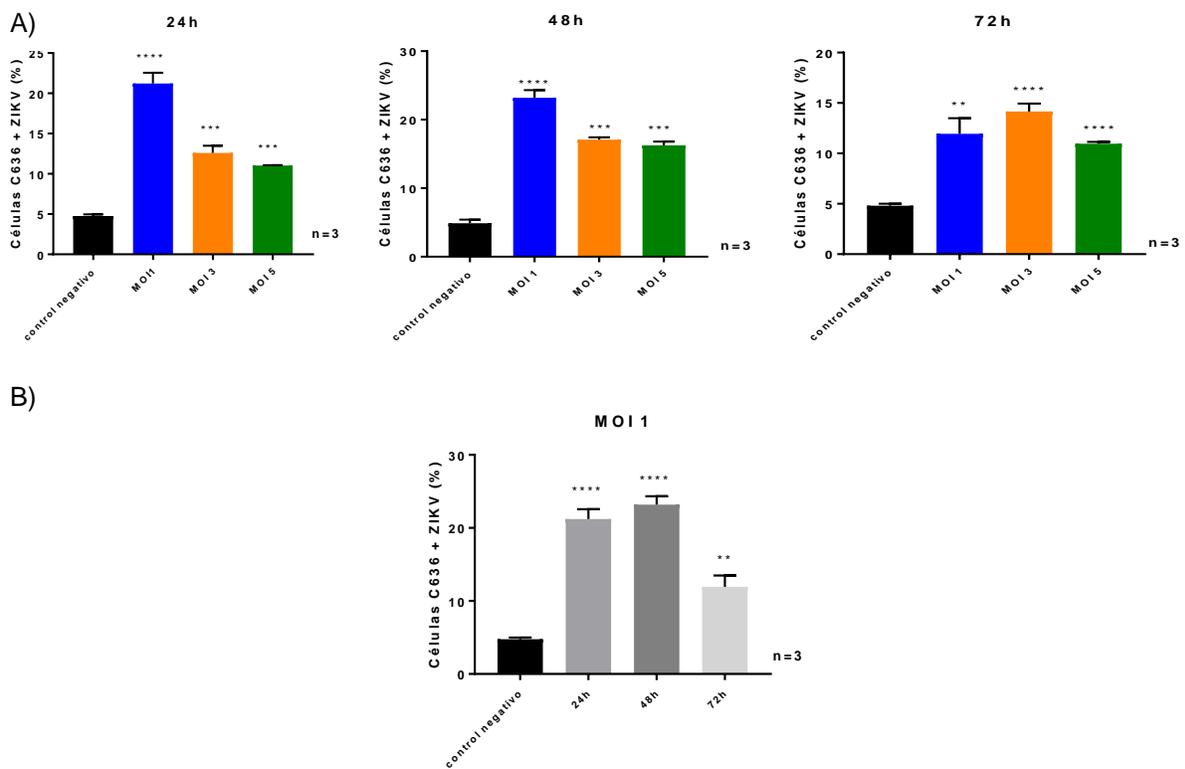


Figura 11. Detección de proteína E viral en células C636 infectadas con ZIKV. A) Gráficos correspondientes al porcentaje de células positivas a la proteína E viral de ZIKV a las 24, 48 y 72h PI; y a diferentes dosis. B) Gráfico donde se compara el porcentaje de células positivas a la proteína E viral con una dosis de MOI de 1 a las 24,48 y 72h PI.

En la figura 12 se puede observar como el porcentaje de IMF para las células control es de 12.4 ± 0.46 , como parte de una respuesta inespecífica; al sustraer este valor a las células C6/36 infectadas con ZIKV, tenemos un valor mínimo de IMF de 42.5 ± 0.51 , y un valor máximo de 56.0 ± 0.78 , debido a la presencia de la proteína E viral. El aumento en el porcentaje de IMF de las células infectadas con ZIKV es de por lo menos 4.4 veces por arriba del control. En el análisis estadístico, se encuentra que hay diferencia significativa de la población celular infectada con ZIKV con respecto al control ($p < 0.0001$), sin embargo, no existe diferencia significativa del porcentaje de IMF entre las distintas dosis empleadas ($p < 0.0001$).

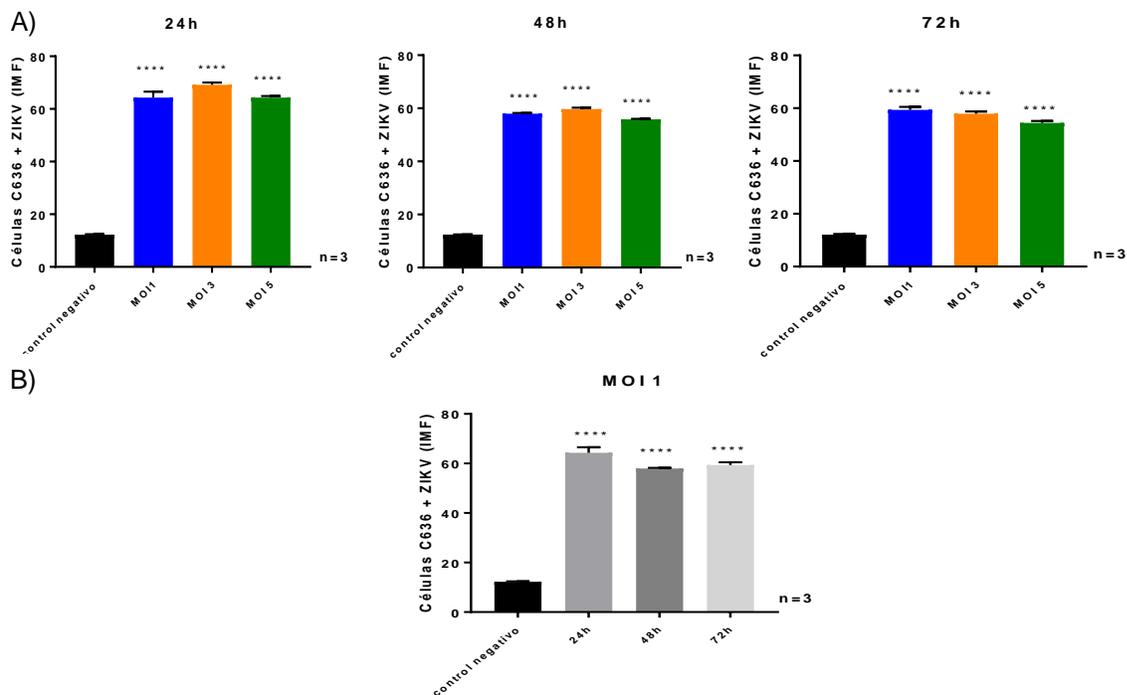


Figura 12. Detección de proteína E viral en células C6/36 infectadas con ZIKV. A) Gráficos correspondientes al porcentaje de IMF de células infectadas con ZIKV a las 24, 48 y 72h PI, y a diferentes dosis. B) Gráfico donde se compara la IMF de células infectadas con ZIKV con una dosis de MOI de 1 a las 24, 48 y 72h PI.

De acuerdo a los datos obtenidos, en los siguientes experimentos se utilizará una MOI de 1 y 48h PI, esto es, debido a que en esta condición puede observarse la mayor cantidad de células positivas a la proteína E viral con un porcentaje de $18.45 \pm 1.12\%$ y un porcentaje de IMF de 4.7 veces más elevado con respecto al control negativo.

Detección de la tetraspanina CD63 en células C6/36 infectadas con ZIKV

Se evaluó la presencia de la tetraspanina CD63 en las células infectadas con ZIKV para poder establecer la mejor condición en la cual las células podrían producir exosomas y utilizar este dato en los ensayos de purificación de exosomas, ya que durante la formación de endosomas tempranos la CD63 se internaliza en la célula, siguiendo la ruta endosomal. En el tiempo óptimo de internalización de CD63 se llevará a cabo la purificación de las VEs (exosomas). Para ello, cultivos de células C6/36, se infectaron con ZIKV a una MOI = 1 (la dosis de infección con el mayor porcentaje de células positivas a la proteína E viral), a las 24, 48 y 72h.

En la figura 13 se denota la presencia de la tetraspanina CD63 en la superficie de las células C6/36. El porcentaje de células positivas a la tetraspanina CD63 se ve aumentado en células infectadas con ZIKV hasta en un $53.7\% \pm 1.49$, con respecto a células sin infectar (mock) con $20.84\% \pm 0.17$, por otro lado, las células control negativo tuvieron una respuesta inespecífica de un $0.95\% \pm 0.07$. Se puede notar que existe al menos un aumento de 1.6 veces en la detección de la tetraspanina en células infectadas con ZIKV ($33.73\% \pm 1.66$) con respecto a las células no infectadas ($20.84\% \pm 0.17$). Se muestra una diferencia significativa, entre las células infectadas a una MOI 1 48h PI con respecto al mock ($p < 0.0001$).

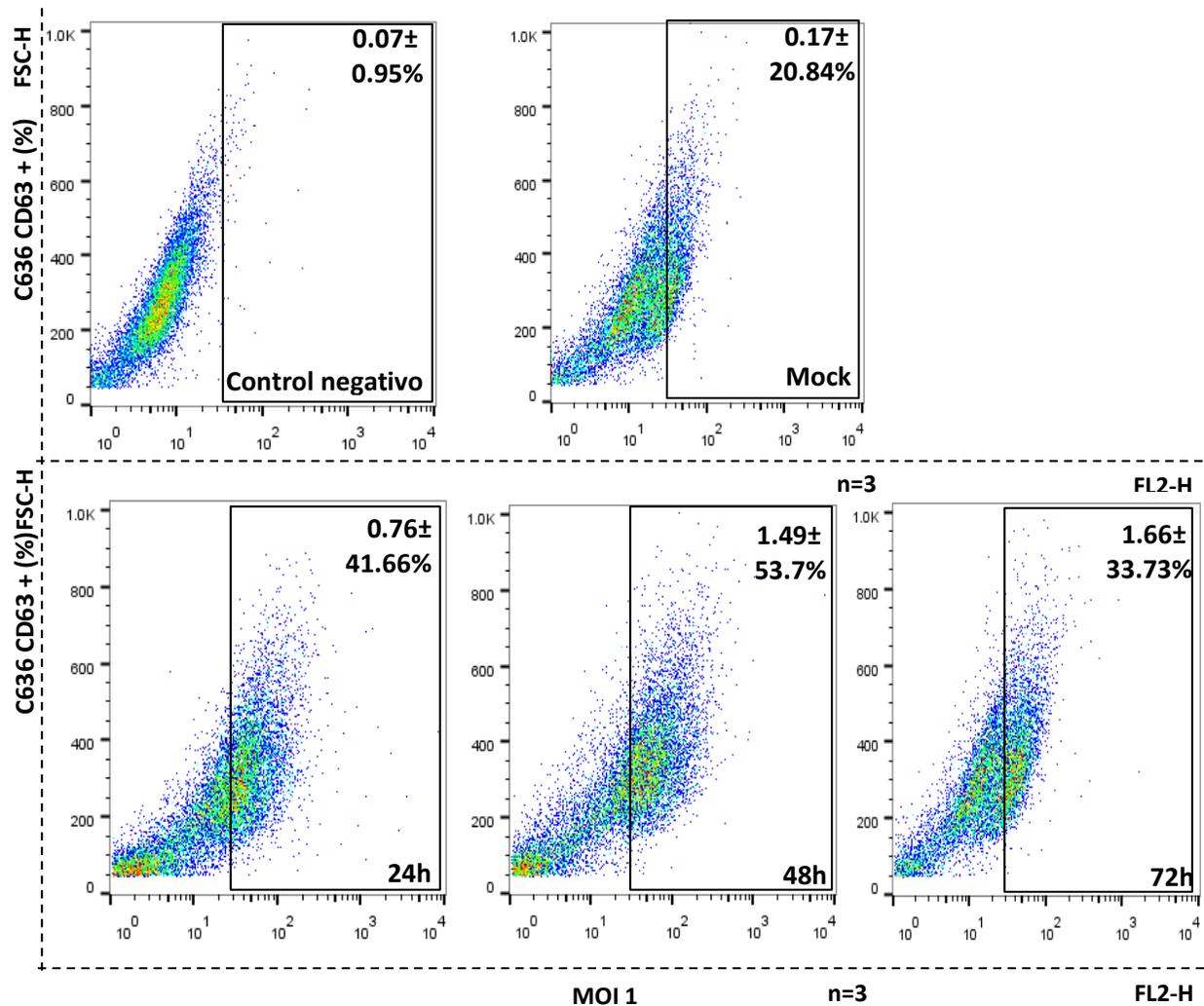


Figura 13. Detección de la tetraspanina CD63 en células C6/36 infectadas con ZIKV. Se puede observar una expresión basal de CD63 en células control (mock) en comparación a un control sin marcar. A distintos tiempos y dosis hay un mayor porcentaje de positividad a CD63 con respecto a los controles. Se coloca un gráfico representativo para cada condición de un experimento hecho por triplicado. Se puede observar la respuesta inespecífica del control negativo.

En la figura 14 se observa que en todas las condiciones evaluadas hay una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas a la tetraspanina CD63 con respecto al mock. Por otro lado, el mock también muestra una diferencia significativa con respecto al control negativo que tiene una respuesta inespecífica; (esta diferencia significativa se indica con asteriscos. * para el mock con respecto al control negativo y ** para las distintas dosis de ZIKV con respecto al mock). No hay una diferencia significativa entre los distintos tiempos PI con MOI de 1 ($p < 0.0001$).

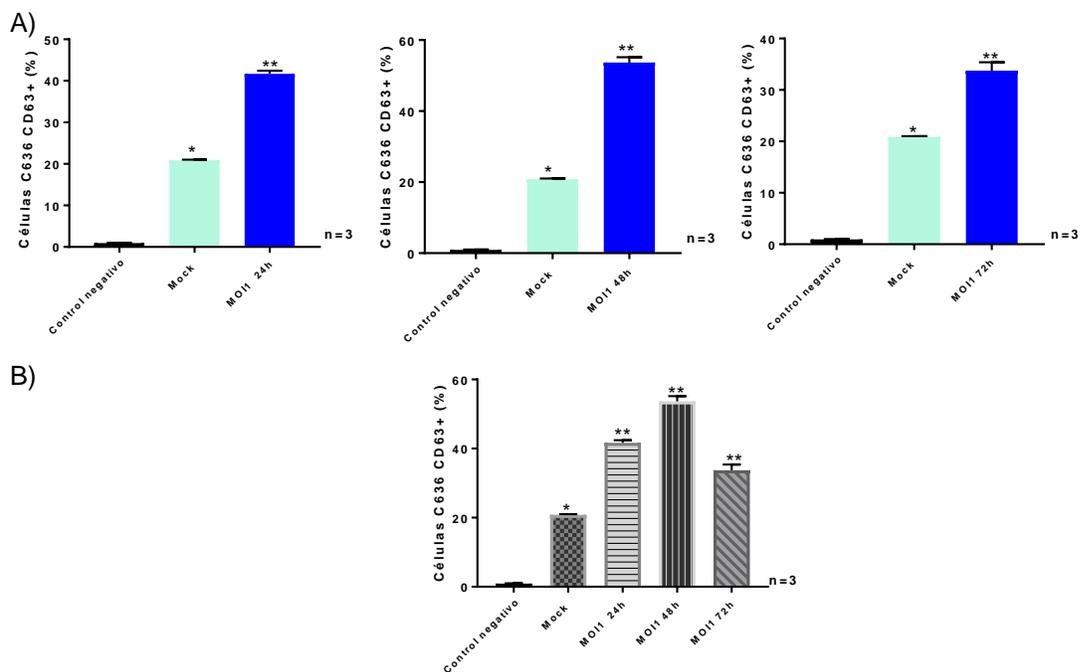


Figura 14. Detección de la tetraspanina CD63 en células C6/36 infectadas con ZIKV. A) Gráficos correspondientes al porcentaje de células C6/36 positivas a la presencia de la tetraspanina CD63 después de haber sido infectadas con una MOI 1 de ZIKV a 24, 48 y 72h PI. B) Gráfico donde se compara el porcentaje de células positivas a la tetraspanina CD63 con una dosis de MOI de 1 a las 24,48 y 72h PI con respecto al mock y el control negativo. El mock es la expresión basal de la tetraspanina CD63 en células sin infectar y el control negativo es la respuesta inespecífica sin marcaje.

En la figura 15 se muestra el porcentaje de la IMF en la presencia de la tetraspanina CD63 de células C6/36 infectadas con ZIKV. Se observa que a la condición de MOI 1 a las 48h PI se obtiene el punto máximo de fluorescencia con 82.8 ± 1.82 , a diferencia del mock con un valor de 46.83 ± 0.4 , existe una diferencia significativa entre la detección de la tetraspanina homóloga a CD63 humana ($p < 0.0001$) y se observa un incremento de hasta 1.8 veces de IMF con respecto a las células sin estímulo viral (mock). Del mismo modo, se puede observar que hay una diferencia significativa en el porcentaje de IMF entre las células infectadas y el mock con respecto al control sin marcaje ($p < 0.0001$), aunque, únicamente a una MOI 1 48h PI se observa una diferencia significativa con respecto al mock ($p < 0.0001$). Por otro lado, se sabe que la mayor cantidad de exosomas liberados por células se da posterior a la internalización de los dominios ricos en tetraspaninas (Dogrammatzis y cols., 2019) fenómeno que se observa en una MOI 1 a las 72h PI con una disminución en la presencia de la tetraspanina homóloga a CD63 ($33.73\% \pm 1.66$), esta información es importante, ya que la decisión de utilizar MOI 1 a las 72h PI para el aislamiento de los exosomas está basado en los hallazgos encontrados en la bibliografía.

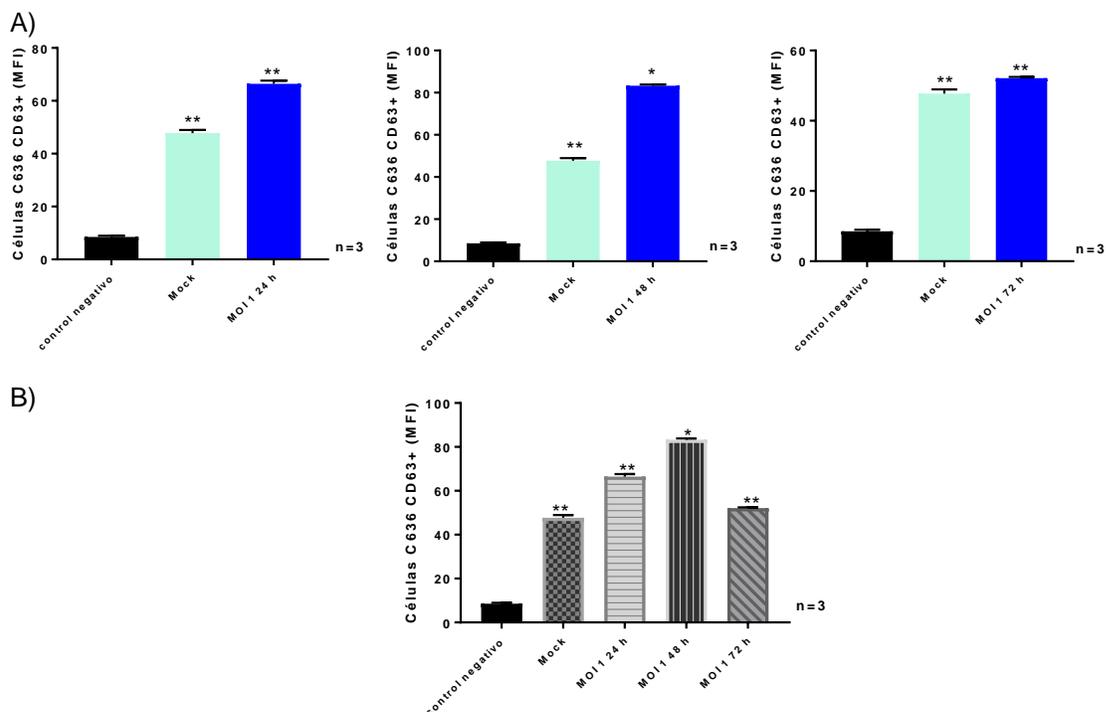


Figura 15. Detección de la tetraspanina CD63 en células C6/36 infectadas con ZIKV. A) Gráficos correspondientes al porcentaje de IMF en células infectadas con ZIKV con una MOI 1 de ZIKV a 24, 48 y 72h PI. B) Gráfico donde se compara el porcentaje de IMF en células infectadas con una dosis de ZIKV MOI de 1 a las 24,48 y 72h PI con respecto al mock y el control negativo. El mock es la expresión basal de la tetraspanina CD63 en células sin infectar y el control negativo es la respuesta inespecífica sin marcaje.

Detección de exosomas CD63⁺ provenientes de células C6/36 infectadas con ZIKV, utilizando perlas paramagnéticas

Se evaluó la presencia de exosomas CD63⁺ provenientes de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV) mediante el acoplamiento a perlas paramagnéticas; se utilizaron alícuotas de exosomas provenientes de células control, libres de infección (mock) y otra de exZIKV, las cuales se analizaron por citometría de flujo y se compararon con el grupo control sin marcaje.

En la figura 16a se observan perlas acopladas a exosomas CD63⁺ tanto en células infectadas con ZIKV como en las que carecen del estímulo viral (mock). Existe una respuesta inespecífica del valor del control sin marcaje con 0.59% ± 0.06, por lo que este porcentaje es sustraído de los otros resultados. Se observa que en células infectadas con ZIKV hay un mayor porcentaje de positividad a exosomas CD63⁺ siendo de 2.04 ± 0.02 con respecto a las células mock que es de 1.06% ± 0.04. Podemos observar que el porcentaje de exosomas CD63⁺ de células infectadas por ZIKV (exZIKV) a comparación de los exosomas CD63⁺ del mock es por lo menos 1.6 veces mayor (con una diferencia significativa de p<0.01, figura 16b). Lo anterior sugiere que el estímulo viral puede provocar un aumento en la síntesis de exosomas.

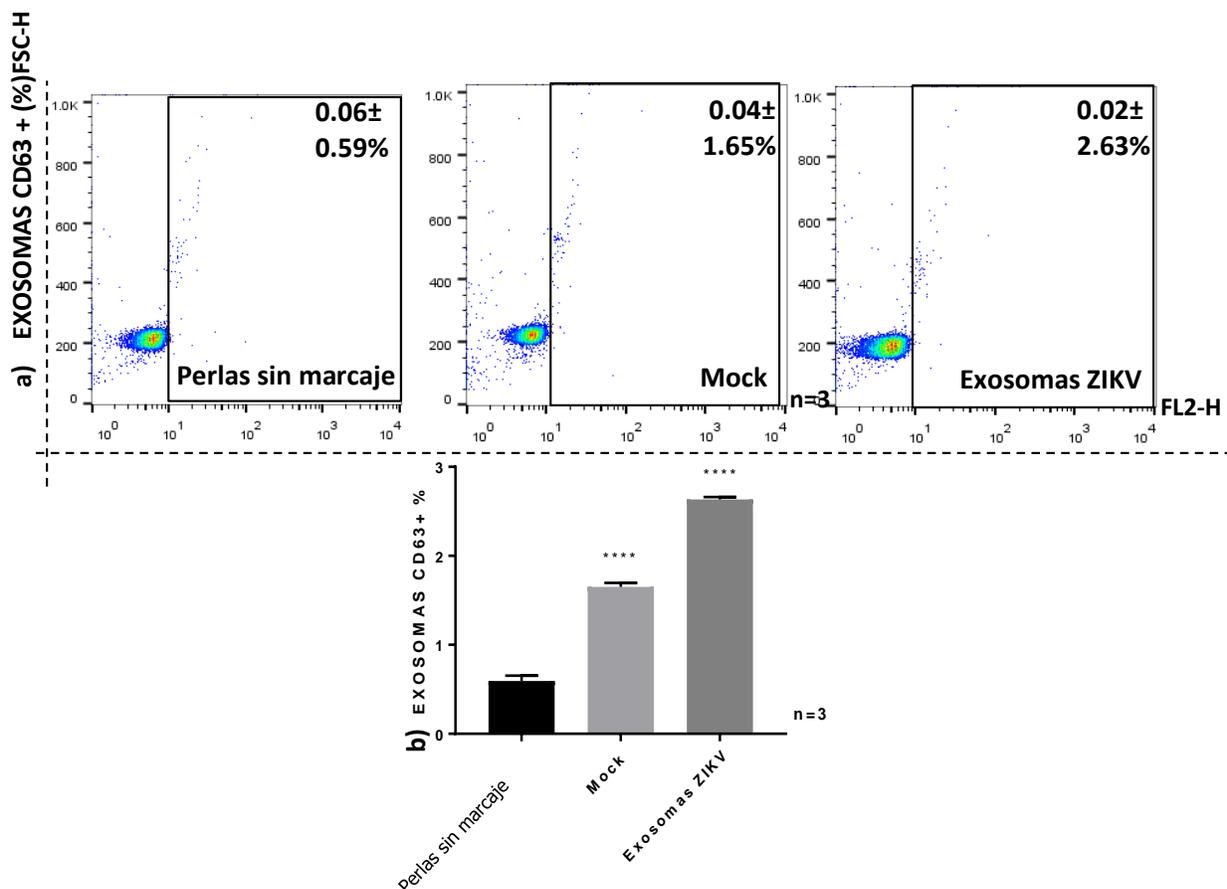


Figura 16. Detección de exosomas CD63⁺ con perlas paramagnéticas. a) Dot plots que muestran la población de exosomas CD63⁺ del grupo control sin estímulo viral (mock) y de los exosomas CD63⁺ liberados de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV). Se coloca un gráfico de un experimento realizado por triplicado, se calcula el promedio y su desviación estándar. b) Gráfico donde se muestra la diferencia en porcentaje de la presencia de exosomas CD63⁺ de exZIKV con respecto al mock.

Caracterización de exosomas de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV) mediante microscopía electrónica de transmisión

Para caracterizar la morfología de los exosomas provenientes de células C6/36 infectadas con ZIKV (exZIKV), como de células sin infectar (mock) se realizó una microscopía electrónica de transmisión (TEM²).

En la figura 17 se puede observar la presencia de vesículas extracelulares (VEs) identificadas como productos celulares que contienen una bicapa lipídica. El tamaño de los exosomas es <200nm (señalados en la imagen por flechas blancas). Tanto en células sin infectar (mock) como en células infectadas con ZIKV (exZIKV) puede observarse la presencia de exosomas.

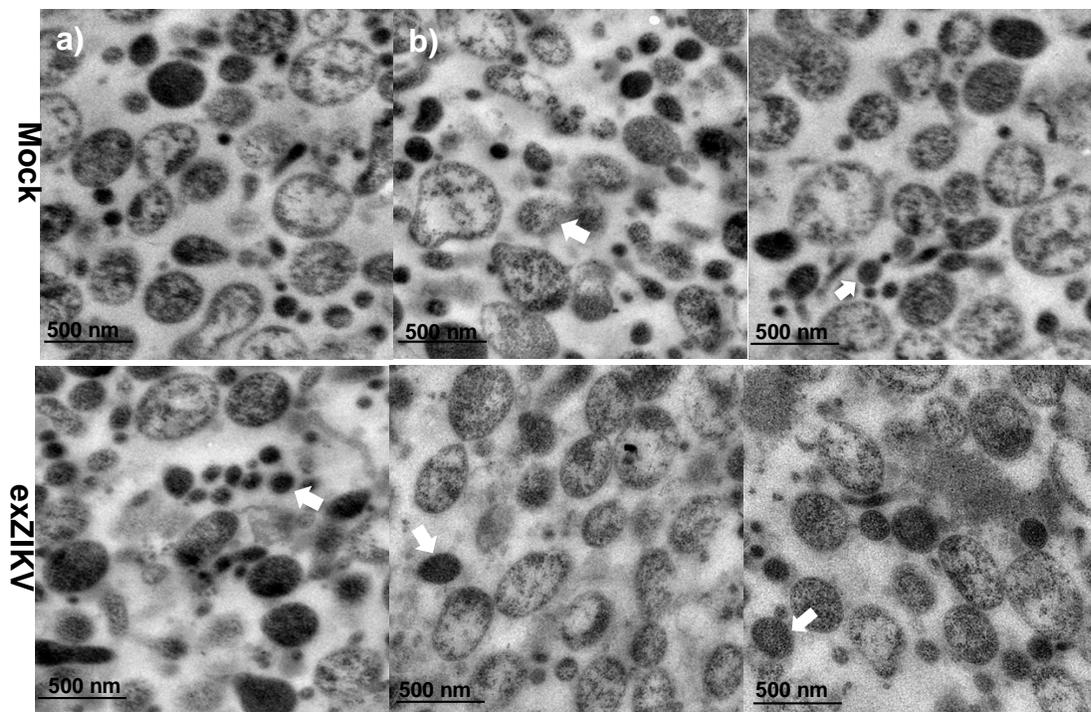


Figura 17. Caracterización morfológica de las VEs derivadas de células C6/36 por TEM² a una escala de 500nm. En la parte superior (a, b y c) se muestran fotografías a diferentes escalas de VEs sin estímulo y en la parte inferior (d, e y f) VEs provenientes de células C6/36 estimuladas con ZIKV a una MOI de 1 a las 72h post infección.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM²) denotan la presencia de vesículas extracelulares, nos demuestran que las células C6/36 infectadas por ZIKV producen una población heterogénea de VEs, entre ellas exosomas.

Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la infección por ZIKV en un modelo murino

Se evaluó la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) en ratones macho BALB/c infectados con distintas dosis del ZIKV a 10^3 , 10^5 UFP a las 24 y 48 horas PI. Para esto, se utilizaron 2 moléculas trazadoras de diferente peso molecular. El primer trazador analizado, con un peso de 960.79g/mol que se une a proteínas plasmáticas de hasta 70kDa fue Azul de Evans (AE), para el cual encontramos que en presencia de ZIKV a las

24 y 48 PI existe una permeabilidad de la BHE, tal como se muestra en la tabla 1. La mayor concentración de AE se encontró en cerebelo con un valor máximo de 0.067 μg de AE/mg de tejido, para una dosis de $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ a las 24h PI; mientras que, a una dosis de $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ tanto a las 24h PI como a las 48h PI se obtuvo la mayor concentración de AE con respecto al control, que tuvo una respuesta inespecífica de 0.011.

Región cerebral \ Dosis/Tiempo PI	Cerebelo	Corteza cerebral	Regiones subcorticales	Promedio (regiones cerebrales)
$1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ 24h	0.067	0.057	0.050	0.058
$1.0 \times 10^5 \text{UFP}$ 24h	0.057	0.061	0.051	0.056
$1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ 48h	0.059	0.059	0.053	0.057
$1.0 \times 10^5 \text{UFP}$ 48h	0.041	0.043	0.037	0.040

Tabla 1. Evaluación de la permeabilidad de la BHE en cerebelo, corteza y regiones subcorticales en un modelo murino infectado con ZIKV. Permeabilidad del trazador Azul de Evans dado en μg de trazador/mg de tejido utilizando diferentes dosis de ZIKV ($1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ y $1.0 \times 10^5 \text{UFP}$) a diferentes tiempos PI (24 y 48h).

El segundo trazador analizado, con un peso molecular de 376.27g/mol, el Na-Fluoresceína (Na-F), mostró una permeabilidad de la BHE con los valores reportados en la tabla 2. La mayor concentración de Na-F se encuentra en cerebelo con un valor máximo de 0.59 μg de Na-F/mg de tejido, a una dosis de $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ a las 24h PI; mientras que, a una dosis de $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ a las 24h PI y 48h PI se obtuvo la mayor concentración de Na-F, con respecto al control, que tuvo una respuesta inespecífica de 0.102.

Región cerebral	Cerebelo	Corteza cerebral	Regiones subcorticales	Promedio (regiones cerebrales)
Dosis/Tiempo PI				
1.0x10 ³ UFP 24h	0.59	0.47	0.38	0.48
1.0x10 ⁵ UFP 24h	0.55	0.54	0.30	0.46
1.0x10 ³ UFP 48h	0.56	0.52	0.32	0.47
1.0x10 ⁵ UFP 48h	0.39	0.41	0.28	0.36

Tabla 2. Evaluación de la permeabilidad de la BHE en cerebelo, corteza y regiones subcorticales en un modelo murino infectado con ZIKV. Permeabilidad del trazador Na-Fluoresceína en μg de trazador/mg de tejido en un experimento utilizando diferentes dosis de ZIKV ($1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ y $1.0 \times 10^5 \text{UFP}$) a diferentes tiempos PI (24 y 48h).

En la figura 18 podemos observar que existe un incremento en la permeabilidad de la BHE en los ratones infectados con ZIKV, con respecto a los ratones control para los trazadores evaluados (AE y Na-F). Se presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) para la permeabilidad de la BHE con $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ en los ratones infectados con ZIKV tanto a las 24 como a las 48h PI, con respecto a los ratones control. Sin embargo, no existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el incremento de la BHE entre las dosis utilizadas de ZIKV, es decir, a dosis de $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ y $1.0 \times 10^5 \text{UFP}$ ZIKV; sin embargo, para la permeabilidad al AE en la corteza cerebral, observamos una diferencia significativa ($p < 0.05$) a una dosis de $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ a las 48h PI con respecto al control.

Debido al análisis antes descrito, la dosis óptima de infección del modelo murino con ZIKV es de $1.0 \times 10^3 \text{UFP}$ a las 48h PI.

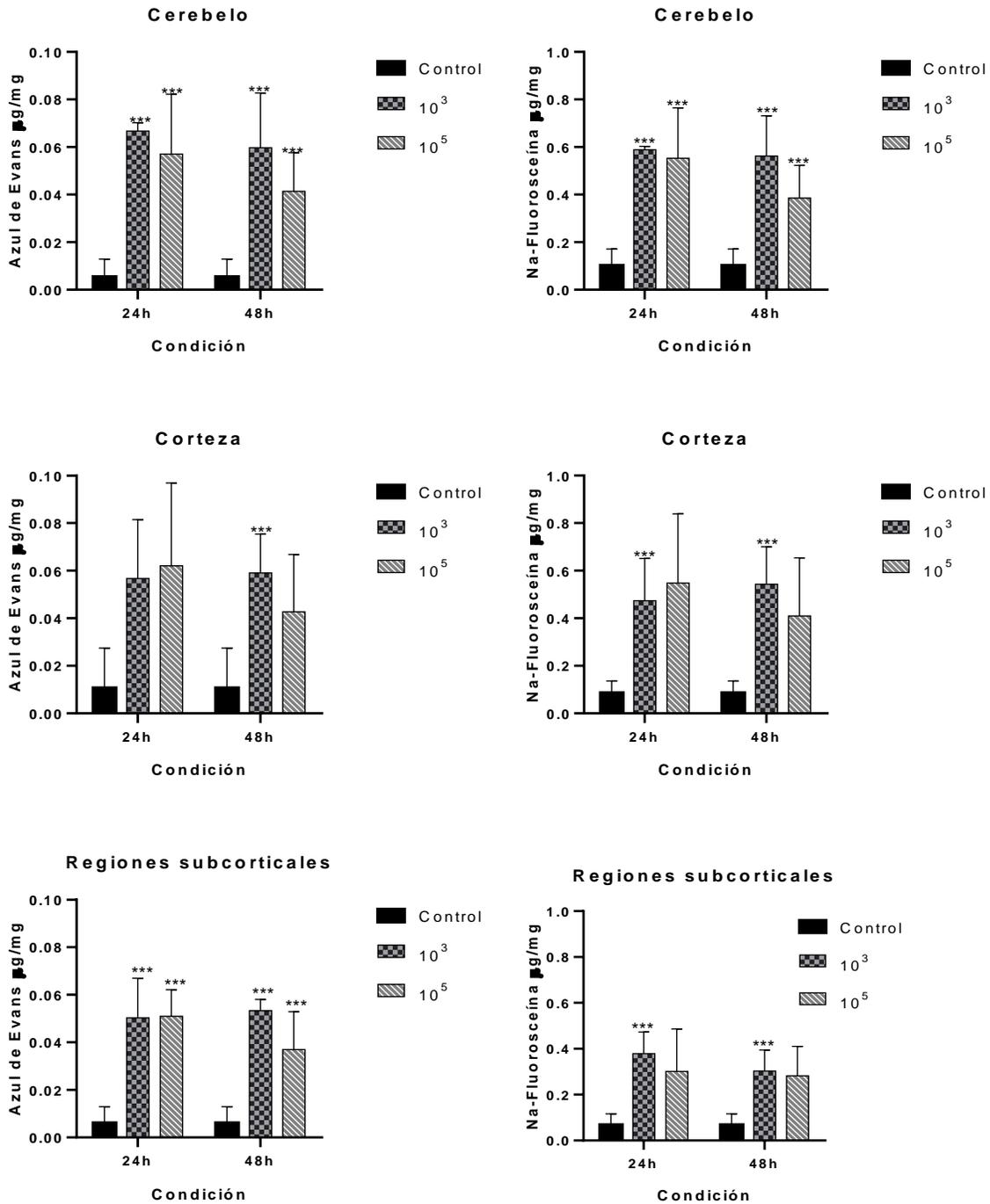


Figura 18. Evaluación de la permeabilidad de la BHE en un modelo murino con ZIKV. Permeabilidad de la BHE en µg/mg para Azul de Evans (izquierda) y Na-Fluoresceína (derecha) en ratones macho BALB/c infectados con distintas dosis de ZIKV a distintos tiempos PI por triplicado, ***p<0.05.

Evaluación del inóculo de exZIKV en un modelo murino para la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Se evaluó la permeabilidad a la BHE con distintas dosis de exZIKV (25, 50 y 100µg de proteína) a 24, 48 y 72h post inoculación. Como se puede observar en la tabla 3 existe permeabilidad de la barrera hematoencefálica para el AE, donde podemos observar un máximo de 0.055µg de AE/mg de tejido, para una concentración de 50 µg de exZIKV a las 72h post-inoculación con respecto al control, con una respuesta inespecífica de 0.005.

Región cerebral Dosis/Tiempo post-inoculación	Cerebelo	Corteza cerebral	Regiones subcorticales	Promedio (regiones cerebrales)
25 µg de proteína 24h	0.028	0.028	0.021	0.026
50 µg de proteína 24h	0.028	0.035	0.024	0.029
100 µg de proteína 24h	0.049	0.055	0.030	0.045
25 µg de proteína 48h	0.034	0.036	0.028	0.033
50 µg de proteína 48h	0.038	0.038	0.032	0.036
100 µg de proteína 48h	0.041	0.037	0.029	0.036
25 µg de proteína 72h	0.027	0.033	0.027	0.029
50 µg de proteína 72h	0.063	0.058	0.044	0.055
100 µg de proteína 72h	0.057	0.047	0.026	0.043

Tabla 3. Evaluación de la permeabilidad de la BHE con exZIKV en cerebelo, corteza y regiones subcorticales. Permeabilidad del trazador Azul de Evans en µg de trazador/mg de tejido utilizando diferentes dosis de exZIKV (25, 50 y 100µg de proteína) a diferentes tiempos post-inoculación (24, 48 y 72h).

Como se puede observar en la tabla 4 existe permeabilidad de la barrera hematoencefálica para el Na-F, donde podemos observar un máximo de 0.516 μ g de Na-F/mg de tejido, para una concentración de 100 μ g de exZIKV a las 24h post-inoculación con respecto al control, con una respuesta inespecífica de 0.102.

Región cerebral Dosis/Tiempo post-inoculación	Región cerebral			Promedio (regiones cerebrales)
	Cerebelo	Corteza cerebral	Regiones subcorticales	
25 μ g de proteína 24h	0.317	0.308	0.186	0.270
50 μ g de proteína 24h	0.345	0.418	0.243	0.335
100 μ g de proteína 24h	0.580	0.615	0.354	0.516
25 μ g de proteína 48h	0.279	0.271	0.206	0.252
50 μ g de proteína 48h	0.424	0.381	0.288	0.364
100 μ g de proteína 48h	0.594	0.495	0.311	0.467
25 μ g de proteína 72h	0.252	0.351	0.208	0.270
50 μ g de proteína 72h	0.437	0.438	0.316	0.397
100 μ g de proteína 72h	0.564	0.720	0.270	0.518

Tabla 4. Evaluación de la permeabilidad de la BHE con exZIKV en cerebelo, corteza y regiones subcorticales. Permeabilidad del trazador Na-Fluoresceína en μ g de trazador/mg de tejido utilizando diferentes dosis de exZIKV (25, 50 y 100 μ g de proteína) a diferentes tiempos post-inoculación (24, 48 y 72h).

Como se observa en la figura 19, desde las 24 horas post-inoculación se observa la permeabilidad de la BHE, existe una diferencia de por lo menos 0.023 μ g de AE/mg de tejido y de 0.215 μ g de Na-F/mg de tejido con respecto al control negativo desde dosis de 25 μ g de proteína hasta 100 μ g de exZIKV.

Para la permeabilidad de la BHE al trazador AE, se observó que en el cerebelo a una dosis de 25 μ g de proteína de exZIKV a las 24h post-inoculación y a una dosis de 100 μ g

de proteína de exZIKV a las 48h post-inoculación no existe diferencia significativa (** $p < 0.05$) con respecto a los ratones control. En la corteza no existe diferencia significativa (** $p < 0.05$) a dosis de 25 μ g de proteína de exZIKV a las 24h post-inoculación, así como tampoco a dosis de 50 μ g de proteína de exZIKV a las 48h post-inoculación con respecto a los ratones control. En las regiones subcorticales se observó una diferencia significativa (** $p < 0.05$) para todas las dosis y tiempos post-inoculación evaluados.

Para la permeabilidad de la BHE al trazador Na-F, existe una diferencia significativa (** $p < 0.05$) con respecto al grupo control, con excepción a las 24 y 48h post-inoculación con 25 μ g de proteína de exZIKV y a las 24h post inoculación con 50 μ g de proteína de exZIKV.

Por otro lado, hay una diferencia significativa entre las dosis inoculadas de exZIKV. En el cerebelo hay una diferencia significativa ($\neq p < 0.05$) a dosis de 50 y 100 μ g de proteína de exZIKV a las 72h post-inoculación con respecto a dosis de 25 μ g de proteína de exZIKV, de por lo menos 0.185 μ g de Na-F/mg de tejido; mientras que a una dosis de 50 μ g de proteína de exZIKV existe una diferencia significativa ($\neq p < 0.05$) de 0.036 μ g de AE/mg de tejido. En la corteza cerebral hay una diferencia significativa ($\neq p < 0.05$) entre dosis de 100 μ g de proteína de exZIKV a las 48h post-inoculación con respecto a dosis de 25 μ g de proteína de exZIKV de 0.285 μ g de Na-F/mg de tejido; además, existe diferencia significativa (**** $p < 0.05$) para dosis de 100 μ g de proteína de exZIKV con respecto a dosis de 25 y 50 μ g de proteína de exZIKV a las 24h post-inoculación, de por lo menos 0.197 μ g de Na-F/mg de tejido; mientras que a una dosis de 50 μ g de proteína de exZIKV existe una diferencia significativa ($\neq p < 0.05$) de 0.025 μ g de AE/mg de tejido. En las regiones

subcorticales no se observa diferencia significativa entre las distintas dosis inoculadas de exZIKV.

Los resultados antes descritos sugieren que en las regiones cerebrales analizadas existe un incremento en la permeabilidad de la BHE cuando los animales son expuestos a cualquier dosis de exZIKV, lo cual demuestra que los exZIKV son capaces de alterar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Por otro lado, se puede proponer que la mejor dosis a la cual los ratones presentan una mayor alteración de la BHE es a la dosis de 50µg de proteína a las 72h post-inoculación para el trazador AE; y a dosis de 100µg de proteína a las 24h post-inoculación para el trazador Na-F.

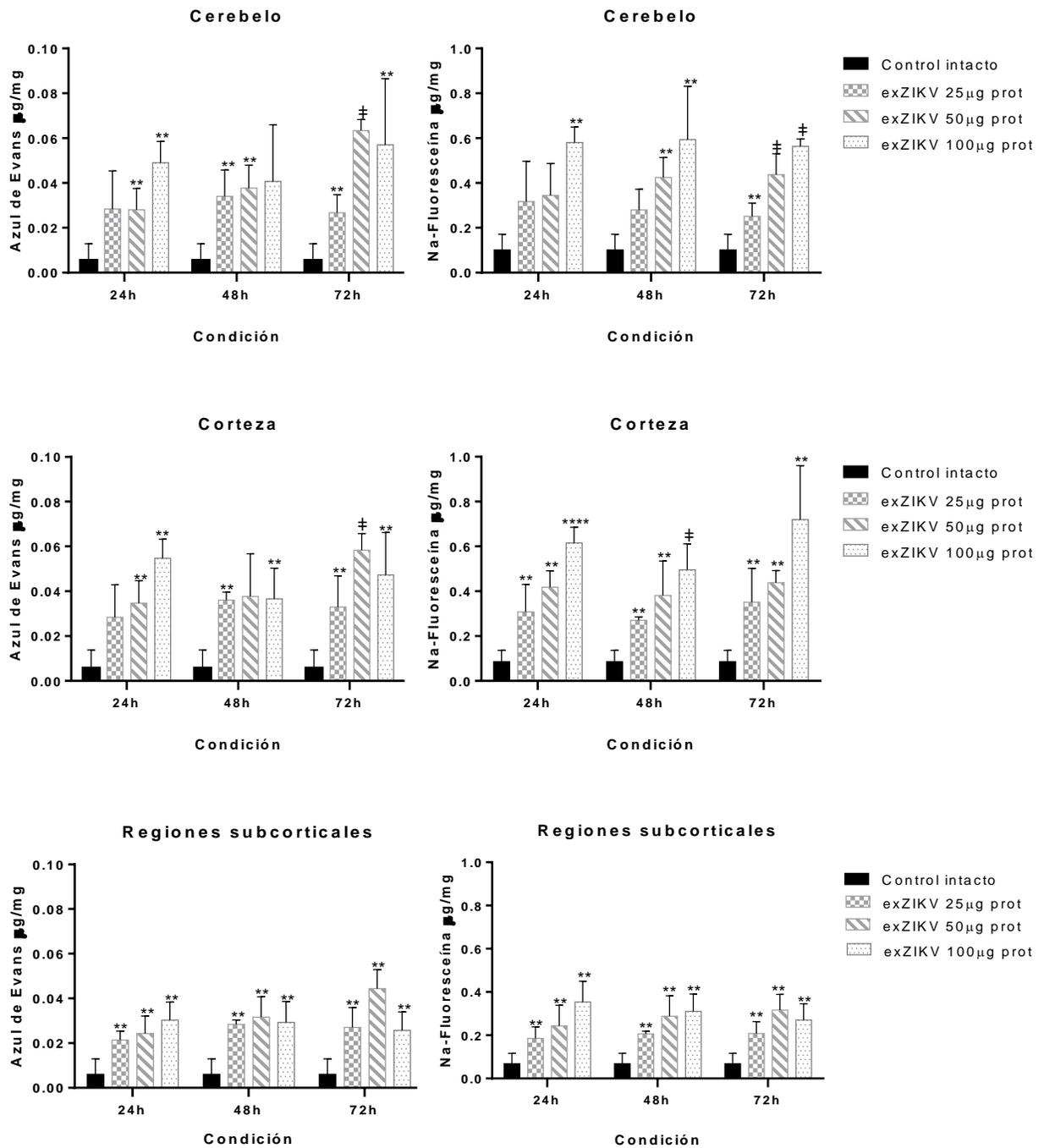


Figura 19. Evaluación de la permeabilidad de la BHE en un modelo murino en presencia de exZIKV.

Gráficos de permeabilidad de la BHE con los trazadores evaluados (AE y Na-F) dado en µg/mg en ratones macho BALB/c estimulados con distintas dosis de exZIKV a distintos tiempos post inoculación por triplicado.

Discusión

El Zika es una virosis sistémica ocasionada por el virus Zika (ZIKV) que en un 80% de los casos produce un cuadro clínico leve, con signos y síntomas autolimitantes. Sin embargo, aproximadamente un 20% de las personas afectadas pueden progresar a formas severas de la enfermedad caracterizadas por complicaciones neurológicas ((Uncini y cols., 2017). Durante la infección por ZIKV, las células del sistema fagocítico-mononuclear son las principales dianas para el virus, las cuales posterior a la infección, liberan productos de activación celular como las vesículas extracelulares (micropartículas, exosomas), cuya función principal es la comunicación intercelular, además de que pueden llevar en su membrana o en el interior diferentes moléculas tanto de las células de origen como elementos estructurales de microorganismos patógenos como los virus. En el presente trabajo, se evaluó si los exosomas provenientes de células C6/36 (larva de mosquito) infectadas por ZIKV, son capaces de producir una alteración en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) en ratones.

Inicialmente se utilizaron células C6/36 infectadas con ZIKV, en una cinética de infección en microscopia de campo claro para observar el efecto citopático y la integridad de las células de mosquito. Tal como se aprecia en la figura 9, las vacuolizaciones en células C6/36 infectadas con ZIKV son un claro indicio de una condición de estrés celular, igualmente reportada (Lee & Shin, 2019). A las 72h PI se puede observar como a la MOI 1 se mantiene una mayor integridad celular a diferencia de la MOI 5, donde se observa un desprendimiento de la monocapa celular, atribuido a la infección de las células con ZIKV, donde en otras investigaciones se ha visto que es capaz de provocar lisis celular (Alpuche-Lazcano y cols., 2018).

Posteriormente, para determinar las mejores condiciones de infección en las cuales las células expresan la proteína E viral en sus membranas (detectada por citometría de flujo, CF) se evaluaron curvas de infección a diferentes MOI (1, 3 y 5) durante 24, 48 y 72h PI. La mayor expresión de la proteína E viral se encontró en las células infectadas con una MOI de 1 a las 48 h PI ($18.45 \pm 1.12\%$, IMF = 45.4 ± 2.15) (Figuras 9-11), el efecto esperado de la infección de ZIKV en células C6/36 era que a mayores MOI de virus y a mayores tiempos de exposición (tiempo PI) hubiera una mayor presencia de la proteína E viral, sin embargo, como muestran los resultados, se observa un pico máximo de la proteína E viral a una MOI 1 a las 48h PI, a diferencia de una MOI 5 72h PI. Cabe destacar que al observar las células C6/36 en microscopia de campo claro (figura 8), podemos observar cómo los efectos citopáticos son mayores a dosis más elevadas y tiempos PI del virus más elevados; por otro lado, en los resultados obtenidos por CF, puede observarse que hay una disminución en la presencia de la proteína E viral para dosis y tiempos PI más elevados (figuras 9-11), lo cual sugiere que hay muerte celular ocasionada por el ZIKV, reflejada en los bajos niveles de proteína E viral a mayores dosis y tiempos PI, análisis adicionales se necesitan para corroborar esta teoría. El pico máximo que fue obtenido a las 48h PI con una MOI 1 es similar a los resultados reportados por Martínez-Rojas y cols. (2020) para células C6/36 infectadas por ZIKV basados en la detección de la proteína E por CF, y contrastan con los modelos reportados por Moser y cols., (2018) y Schultz y cols., (2021) en donde hubo infección a bajas concentraciones de virus, con MOI 0.01 y 0.3, respectivamente.

En la bibliografía se encontró que las células de mosquito (C6/36), expresan una tetraspanina que es una proteína homóloga a CD63 (Ahmed y cols., 2021; Martínez-

Rojas y cols., 2020), y sabemos que CD63 funciona como un marcador exosomal (Kalra y cols., 2016), se decidió utilizar un anticuerpo antiCD63 humano para evaluar la expresión de la proteína homóloga a CD63 expresada en células C6/36, en MOI 1 a través de diferentes tiempos PI (24, 48 y 72h). Al observar y analizar los resultados presentados en las figuras 13-15 se halló que a una MOI 1 48h PI se encuentra el pico máximo de la expresión de la proteína homóloga a CD63 humana en un $53.7\% \pm 1.49$ de la población celular con una IMF de 82.8 ± 1.82 . Se puede observar que hay un incremento en la expresión de la tetraspanina CD63 a las 24h PI ($41.66\% \pm 0.76$) con respecto a las 48h PI ($53.7\% \pm 1.49$), lo cual significa que el ZIKV está provocando este aumento, algo que se refleja al comparar con el mock ($20.84\% \pm 0.17$); por lo tanto, desde las 24h PI el ZIKV favorece la expresión de la proteína CD63 en la superficie de las células C6/36. Por otro lado, existe un declive en la expresión de la TSP homóloga a CD63 a las 72h PI ($33.73\% \pm 1.66$), este hecho puede ser atribuido a la internalización de los dominios ricos en tetraspaninas (Dogrammatzis y cols., 2019), aunque, cabe destacar que, a MOI 1 48h PI se encontró la mayor expresión de la proteína E viral encontrada por CF, y a las 72h PI se halló una disminución de esta expresión debido al desprendimiento de la monocapa celular a este tiempo PI, por lo que la expresión de la TSP homóloga a CD63 pudo igualmente haberse visto afectada por el fenómeno mostrado en la cinética de infección (figuras 9-12). Sin embargo, según las observaciones de la TSP homóloga a CD63 para ZIKV y DENV (Martínez-Rojas y cols., 2020; Vora y cols., 2018), se observa la internalización de la TSP homóloga a CD63 en un experimento similar, y se recupera la mayor cantidad de exosomas posterior a las 24h de observar dicho fenómeno. De acuerdo a los resultados obtenidos y a la bibliografía revisada (Vora y cols., 2018), se decidió utilizar una MOI 1 a las 72h PI para obtener la mayor recuperación de exosomas

derivados de células C6/36 infectados por ZIKV (exZIKV) por ultracentrifugación diferencial.

Los exosomas aislados por ultracentrifugación diferencial se identificaron por la presencia de la tetraspanina CD63, empleando el acoplamiento a perlas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD63 específicos para ser detectadas por CF. Como se puede observar en la figura 16, se encontró que como producto de la infección por ZIKV hubo un incremento de 1.6 veces más de exosomas CD63⁺ acoplados a las perlas ($2.63 \pm 0.02\%$) con respecto a los exosomas que se liberan basalmente de células C6/36 no infectadas (1.65 ± 0.04). Se puede observar que al infectar células C6/36 con ZIKV hay un incremento en la producción de exosomas, eso quiere decir que el virus está interviniendo en el mecanismo de biogénesis de VEs. Puede suceder que, al momento que el virus libera su contenido viral dentro de la célula se genera una respuesta celular que favorece la biogénesis de exosomas, ya que, en la bibliografía, se reporta que el estrés celular, la presencia de proteínas, citocinas, y la adversidad del medio, son algunos de los factores que incrementan la producción de exosomas a nivel celular (Alenquer & Amorim, 2015; Anderson y cols., 2016; Gurunathan y cols., 2021). Además, este incremento en los niveles de exosomas o en la expresión de tetraspaninas como consecuencia de las infecciones virales no es exclusivo a ZIKV, ya que se ha reportado que exosomas CD63⁺ CD81⁺ CD9⁺ provenientes de células dendríticas humanas infectadas con DENV y VEs (especialmente exosomas de tamaños de 50-60nm) provenientes de *Aedes aegypti* muestran un aumento en su expresión, o un aumento en la expresión de la TSP homóloga a CD63 del mosquito (Gold y cols., 2020; Martins y cols., 2018). Por otro lado, en la bibliografía se reporta que en células infectadas por

ZIKV, ya sea astrocitos fetales o células neuronales corticales murinas, existe una mayor producción de exosomas demostrado por técnicas microscópicas (Huang y cols., 2018; Zhou y cols., 2019). Con los resultados obtenidos en la investigación y la bibliografía correspondiente, se puede decir que el ZIKV produce un aumento en la biogénesis de exosomas CD63⁺ en células C6/36, principalmente observado por un incremento en la ruta de la esfingomiélin en ZIKV (Zhou y cols., 2019). No obstante, experimentos adicionales obteniendo exosomas a MOI 1 48h PI y evaluando la presencia de la proteína homóloga a CD63 humana mediante el acoplamiento de perlas paramagnéticas son necesarios para evaluar si hay una mayor recuperación de exosomas a las 72h PI derivado de la internalización de CD63 (Dogrammatzis y cols., 2019), o si se obtiene una mejor recuperación a las 48h PI cuya población celular positiva a la proteína E viral es mucho mayor que a las 72h PI.

Las imágenes de la TEM² mostraron que morfológicamente los exosomas de células C6/36 infectadas son heterogéneos, definidos por una bicapa lipídica y menores a 200 nm (figura 17), del mismo modo se halla la presencia de exosomas para células sin infectar con las mismas características que los exosomas de células C6/36 infectadas (exZIKV); por otro lado, se observa que hay una población heterogénea de VEs, lo cual refuerza la información encontrada en la literatura, donde las VEs son de diversos tamaños dado su origen biosintético y a su contenido interno (Alenquer & Amorim, 2015; Kalra y cols., 2016; Kowal y cols., 2014), además, este hecho nos indica que las células infectadas también son capaces de liberar vesículas con tamaños superiores a la de los exosomas (>200nm), un hecho que también ha sido reportado por otros estudios con modelos de infección de ZIKV y DENV con células de mosquito (C6/36), en dichos

estudios, han reportado tamaños de exosomas de 125.5 ± 1.6 nm por la técnica de análisis de rastreo de nanopartículas (Martínez-Rojas y cols., 2020) o de 97.19 ± 10.50 nm por la técnica de dispersión dinámica de luz (Reyes-Ruiz y cols., 2019), ambos obtenidos por ultracentrifugación diferencial; para conocer el tamaño promedio de la población celular en exosomas de células mock o exZIKV, técnicas como las anteriormente descritas pueden realizarse para obtener una conclusión más robusta. Sin embargo, el estudio de acoplamiento a perlas paramagnéticas en conjunto con la TEM², consolidan la presencia de exosomas CD63⁺ de células C6/36 infectadas por ZIKV, por lo cual procedimos a determinar su funcionalidad sobre la BHE en un modelo *in vivo* murino.

Un modelo de infección *in vivo* tiene como ventaja que la respuesta inmunológica y fisiológica del huésped que es muy cercana a la del humano, los costos y rapidez en su producción, la facilidad del manejo de los animales, así como la opción de modificar genéticamente a este modelo animal para crear ciertas mutaciones que ayuden a demostrar funciones específicas de biomoléculas, a pesar de que, por otro lado, hay limitaciones para el estudio de la neuropatogenia por ZIKV, el principal de ellos es que la reproducibilidad de los signos y síntomas característicos del Zika en el humano no son apreciables en el ratón (Estes y cols., 2018).

Por lo que, previo a la evaluación de la función de los exZIKV sobre la permeabilidad de la BHE *in vivo*, determinamos cómo el virus en su forma libre puede alterarla.

Al realizar el ensayo de permeabilidad de la BHE con ZIKV se puede observar que hay un incremento en la permeabilidad de la BHE desde dosis bajas de ZIKV (1.0×10^3 UFP), y se mantiene a dosis más altas (1.0×10^5 UFP) para ambos trazadores, sin embargo, la permeabilidad fue mayor en Na-F por una orden de magnitud, esto puede atribuirse a que la molécula es de un menor peso molecular y no se une a proteínas séricas (Saunders y cols., 2015).

Para ambos trazadores se demostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) a la permeabilidad de la BHE, desde dosis de virus bajas (1.0×10^3 UFP) a tiempos cortos (24h PI) con respecto al control intacto, para el cerebelo y las regiones subcorticales (figura 18). Se puede observar que exclusivamente a dosis de 1.0×10^3 UFP a las 48h PI hay diferencia significativa ($p < 0.05$) a la permeabilidad de la BHE con respecto al control intacto en la corteza cerebral para ambos trazadores; este comportamiento puede deberse a que la composición de la BHE cambia a lo largo de cada región cerebral (Escobar & González, 2008), por lo tanto, la permeabilidad de los trazadores se ve afectada. Por otro lado, se puede observar que en la corteza cerebral la permeabilidad a AE solamente resulta significativa ($p < 0.05$) para dosis de 1.0×10^3 UFP a las 48h PI, a diferencia de la permeabilidad de Na-F donde resulta significativa ($p < 0.05$) para dosis de 1.0×10^3 UFP a las 24 y 48h PI, como mencionan Saunders y cols., (2015) debido a que el AE muestra un comportamiento de unirse a las proteínas séricas, que lo hace convertirse en un compuesto de mayor tamaño (70KDa) lo cual restringe en cierta medida su difusión.

Por otro lado, a dosis de virus altas (1.0×10^5 UFP), a las 24 y 48h PI, para ambos trazadores, existe una menor permeabilidad hacia la BHE con respecto a dosis más bajas de 1.0×10^3 UFP (salvo corteza cerebral a las 24h PI)(figura 18) este comportamiento

puede ser atribuido al hecho que los ratones tienen un eficiente sistema de respuesta al virus mediado por interferón de tipo I y II (IFN) (Olagnier y cols., 2016), en el cual a dosis más altas de virus hay una mejor respuesta inmunológica por parte del ratón, lo que provoca una respuesta rápida para contrarrestar el daño ocasionado a la BHE, ocasionando que se reconstituya la BHE y haya una menor permeabilidad a los trazadores analizados; aunque estudios adicionales son necesarios para confirmar esta teoría.

Además, también puede observarse que a dosis altas de 1.0×10^5 UFP a las 48 h PI, y en algunas regiones cerebrales a dosis de 1.0×10^3 UFP a las 48h PI existe una menor alteración en la permeabilidad de la BHE con respecto a tiempos más cortos de 24h PI (Tabla 1 y 2). Esto puede suceder cuando existe un daño a la BHE, ya que existe una mayor infiltración de leucocitos en el SNC, los cuales desembocan cuadros inflamatorios no deseados para el organismo, el cual es percibido por los astrocitos, y posteriormente secretan al medio factores protectores vasculares los cuales reparan la BHE, devolviendo la integridad y permeabilidad que la caracteriza (Michinaga & Koyama, 2019). Por otra parte, puede ocurrir una disminución de la carga viral, esto debido a la respuesta inmunológica del ratón mediada por IFN (Olagnier y cols., 2016). Estos mecanismos pueden explicar por qué a dosis más altas de ZIKV y tiempos más prolongados PI existe una menor permeabilidad a la BHE, sin embargo, para evaluar si el comportamiento se mantiene a dosis más altas de virus y tiempos más prolongados PI, se requiere realizar un estudio más robusto.

Al comparar las regiones cerebrales podemos ver como existe una mayor permeabilidad a la BHE en el cerebelo y corteza cerebral con respecto a las regiones

subcorticales. Este comportamiento es similar al encontrado por el grupo de trabajo (Avilez-Avilez, 2020), donde infectan ratones con ZIKV, y observan permeabilidad de la BHE desde las 24h PI, siendo el cerebelo y la corteza cerebral las áreas que mostraron una mayor permeabilidad a los trazadores utilizados (Azul de Evans y Na-F). Esto puede ser atribuido al hecho de que en cada región cerebral hay distintos componentes que regulan la integridad de la BHE, hallazgo que fue reportado al observar ratones con genes silenciados (como por ejemplo el gen que codifica para la ocludina, una TJP, *Ocln*, este silenciamiento puede ser de fenotipo homocigoto o heterocigoto) involucrados en la misma, cuya deficiencia o silenciamiento muestra una alteración de la BHE para ciertas regiones cerebrales, siendo afectaciones región específico, y no encontradas a lo largo de todo el SNC (Sweeney y cols., 2019).

Sin embargo, el hecho de que la BHE sea permeable para ambas sustancias, indica un daño ocasionado a la BHE del ratón por el ZIKV, es decir, que el virus tiene la capacidad de alterar la permeabilidad de la BHE per se, esto también ocurre con otros *Flavivirus* como JEV, que aumenta la permeabilidad de la BHE a través de la relocalización y disminución en la expresión de TJPs (ZO-1 y claudina-5), o DENV que aumenta la permeabilidad vascular y se encontró tanto en células neuronales como en células endoteliales y microglia, principalmente en ratones que manifestaban sintomatología neurológica, aunque en un caso particular, el WNV produce una alteración en la BHE como consecuencia de la infección y no como método de entrada al SNC (Mustafá y cols., 2019). Aunque, por otro lado, Papa y cols., (2017) reportan la entrada del ZIKV de manera basolateral sin alteración en la permeabilidad de la BHE en un modelo *in vivo*; hecho que difiere con el encontrado en nuestro grupo de trabajo, donde

se encontró que el ZIKV altera la permeabilidad de la BHE para todas las regiones cerebrales analizadas, y tal incremento en la permeabilidad es demostrado en la figura 18. El virus se distribuye a través del torrente sanguíneo del ratón, y la respuesta inmune del ratón para erradicarlo puede provocar una neuroinflamación que provoque el incremento en la permeabilidad de la barrera (Banks & Erickson, 2010; Kempuraj y cols., 2016).

La evaluación del efecto que tienen los exZIKV (exosomas de células C6/36 infectadas con ZIKV) sobre la permeabilidad de la BHE en un modelo *in vivo* se realizó y modificó de la metodología propuesta por Avilez Avilez, (2020); y Gómez-González y cols., (2013). El análisis de los exosomas que provienen de células infectadas con virus ha sido recientemente investigado, en un modelo donde ratones se inoculan con exosomas de células neuronales infectadas con VIH-1 en un rango de 0.1-100 μ g de proteína, muestran que hay una mayor respuesta a la luciferasa (gen reportero) lo que denota una mayor cantidad de virus que puede entrar a las células (Crenshaw y cols., 2018; Sims y cols., 2014). Se sabe que los exosomas de células neuronales corticales (Zhou y cols., 2019) y de células de mosquito C6/36 (Martínez-Rojas y cols., 2020) tienen ARN de ZIKV en su contenido, y dado que en experimentos con exosomas provenientes de células infectadas por ZIKV (Zhou y cols., 2019) utilizan dosis de 30 μ g de lisado exosomal para detectar proteína E viral por técnicas moleculares, obteniendo resultados satisfactorios, se decidió tomar dosis de 25, 50 y 100 μ g de proteína de las alícuotas de exZIKV para evaluar la permeabilidad de la BHE contra los exZIKV. La concentración de proteína de las alícuotas de exZIKV fue determinada mediante la técnica de BCA, una técnica que es robusta y muy sensible para detectar ligeros cambios del orden de microgramos de proteína

(Reichelt y cols., 2016). Los exZIKV se inocularon a ratones macho BALB/c de 20-25g de peso para ver el efecto sobre la permeabilidad a las 24, 48 y 72h post inoculación. Los exZIKV se inactivaron a la luz ultravioleta, con el fin de eliminar la posibilidad de tener partículas virales libres, mostrando resultados positivos (Martínez-Rojas y cols., 2020), ya que en el proceso de aislar exosomas, la ultracentrifugación diferencial, al final en el pellet existen tanto exosomas como partículas virales libres de ZIKV y no existe un paso posterior para discriminar entre ambos (Vora y cols., 2018).

Se puede observar que hay permeabilidad a la BHE tanto para azul de Evans como para Na-Fluoresceína, sin embargo, nuevamente hay una diferencia en una orden de magnitud en la permeabilidad hacia Na-Fluoresceína, esto atribuido a lo mencionado anteriormente por Saunders y cols., (2015). La estimulación de los ratones con exZIKV muestra que por sí mismos alteran la permeabilidad de la BHE, tal como lo hallamos para la infección con ZIKV, esto sucede desde las concentraciones más bajas del inóculo de exZIKV (25 μ g de proteína) a los tiempos más bajos (24h post inoculación), hasta las concentraciones más altas (100 μ g de proteína) a los tiempos más altos (72h post inoculación). Hay un patrón que puede observarse en la figura 19, donde la permeabilidad a Na-Fluoresceína parece ser dosis y tiempo dependiente (con excepción de las regiones subcorticales a 100 μ g de proteína), se puede observar que a mayor concentración de proteína y a tiempos más largos existe una mayor alteración en la permeabilidad de la BHE, a diferencia del comportamiento encontrado para el virus libre, donde a tiempos mayores (48h PI) y dosis más altas (1.0×10^5 UFP) tiende a haber una disminución en la permeabilidad de la BHE, por lo tanto, aquí los exZIKV pueden estar afectando la forma

en la que el virus altera la permeabilidad de la BHE (Martínez-Rojas y cols., 2020), con respecto a su forma libre (ZIKV).

Por otro lado, podemos observar que, de nuevo en la corteza cerebral y el cerebelo existe una mayor permeabilidad de la BHE con respecto a las regiones subcorticales para ambos trazadores, hecho similar al obtenido para el virus libre, atribuido a lo antes descrito (Sweeney y cols., 2019). Al observar la figura 19, también notamos que hay un patrón característico para la dosis de 100 μg de proteína, y se observa que para periodos largos de tiempo en las regiones subcorticales la permeabilidad va disminuyendo, aunque sea ligeramente, este fenómeno es similar al encontrado para dosis altas de virus libre ($1.0 \times 10^5 \text{UFP}$), el cual puede explicarse dada la respuesta inmune del ratón al virus y la reparación de la BHE, fenómenos antes discutidos (Michinaga & Koyama, 2019; Olagnier y cols., 2016), además de que el comportamiento de ésta dosis para corteza y cerebelo es irregular, lo cual puede indicar varios mecanismos que suceden en el modelo *in vivo* en contramedida de la infección.

La mejor dosis de exZIKV encontrada para la permeabilidad de la BHE fue la concentración de 50 μg de proteína a las 72h post inoculación para las tres regiones cerebrales analizadas para azul de Evans y de 100 μg de proteína a las 24h post-inoculación para Na-Fluoresceína, sin embargo, cabe destacar que a tiempos más prolongados a dosis de 100 μg de proteína la permeabilidad de Na-F disminuye y no tiene un comportamiento uniforme a diferencia de dosis de 50 μg de proteína que tiene un comportamiento dosis dependiente, se requiere utilizar una población (*n*) más grande para observar a que dosis de exZIKV es más permeable la BHE para el trazador Na-F. Por lo tanto, en conjunto, para ambos trazadores la mejor dosis para evaluar el efecto de

los exZIKV resulta en 50 μ g de proteína a las 72h post inoculación, hecho que es similar al encontrado por el grupo de trabajo para exosomas de monocitos humanos THP-1 infectados con ZIKV, donde a dosis de 50 μ g de proteína se obtiene una mayor permeabilidad de la BHE, obteniendo un punto máximo a las 72h post inoculación (Avilez-Aviles, 2020).

Tanto el virus libre (ZIKV) como los exZIKV son capaces de alterar la permeabilidad de la BHE, aunque más estudios se necesitan para saber si la permeabilidad de la BHE está sujeta por los exosomas de células C6/36 per se, o si el estímulo viral con ZIKV, genera exZIKV, y estos son los responsables de alterar la permeabilidad de la BHE.

Conclusiones parciales

Se demostró que el ZIKV por sí mismo favorece el incremento en la permeabilidad de la BHE en un modelo murino con ratones macho BALB/c.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio nos muestran la producción de exosomas y otras VEs provenientes de células C6/36 naïve y de células infectadas por ZIKV, además de que los exosomas provenientes de células infectadas (exZIKV) alteran la permeabilidad de la BHE en un modelo murino de ratones macho BALB/c. Los hallazgos antes descritos pueden constituir un fenómeno importante en el esclarecimiento de los mecanismos patogénicos en casos severos por ZIKV, donde el virus ingresa al SNC alterando la integridad de la BHE.

Referencias bibliográficas

- Ahmed, W., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2021). Tetraspanins as Potential Therapeutic Candidates for Targeting Flaviviruses. *Frontiers in Immunology*, 12, 630571. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630571>
- Alenquer, M., & Amorim, M. J. (2015). Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses*, 7(9), 5066-5083. <https://doi.org/10.3390/v7092862>
- Alpuche-Lazcano, S. P., McCulloch, C. R., Del Corpo, O., Rance, E., Scarborough, R. J., Moulard, A. J., Sagan, S. M., Teixeira, M. M., & Gatignol, A. (2018). Higher Cytopathic Effects of a Zika Virus Brazilian Isolate from Bahia Compared to a Canadian-Imported Thai Strain. *Viruses*, 10(2), 53. <https://doi.org/10.3390/v10020053>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0450-6>
- Aubry, F., Jacobs, S., Darmuzey, M., Lequime, S., Delang, L., Fontaine, A., Jupatanakul, N., Miot, E. F., Dabo, S., Manet, C., Montagutelli, X., Baidaliuk, A., Gámbaro, F., Simon-Lorière, E., Gilsoul, M., Romero-Vivas, C. M., Cao-Lormeau, V.-M., Jarman, R. G., Diagne, C. T., ... Lambrechts, L. (2021). Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nature Communications*, 12(1), 916. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21199-z>

- Avilez Avilez, J. J. (2020). *Participación de los exosomas de monocitos en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la infección por el virus Zika*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Banks, W. A., & Erickson, M. A. (2010). The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 26-32.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.031>
- Blair, C. D., & Olson, K. E. (2014). Mosquito immune responses to arbovirus infections. *Current opinion in insect science*, 3, 22-29.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.005>
- Carod-Artal, F. J. (2018). Neurological complications of Zika virus infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 16(5), 399-410.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1466702>
- Counotte, M. J., Kim, C. R., Wang, J., Bernstein, K., Deal, C. D., Broutet, N. J. N., & Low, N. (2018). Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLoS Medicine*, 15(7), e1002611.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002611>
- Crenshaw, B. J., Gu, L., Sims, B., & Matthews, Q. L. (2018). Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *The Open Virology Journal*, 12, 134-148. <https://doi.org/10.2174/1874357901812010134>
- De Lellis, L., Florio, R., Di Bella, M. C., Brocco, D., Guidotti, F., Tinari, N., Grassadonia, A., Lattanzio, R., Cama, A., & Veschi, S. (2021). Exosomes as Pleiotropic Players in Pancreatic Cancer. *Biomedicines*, 9(3), 275.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9030275>

- Dogrammatzis, C., Deschamps, T., & Kalamvoki, M. (2019). Biogenesis of Extracellular Vesicles during Herpes Simplex Virus 1 Infection: Role of the CD63 Tetraspanin. *Journal of Virology*, 93(2), e01850-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01850-18>
- Escobar, A., & González, B. G. (2008). Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(5), 395-405.
- Esposito, S., & Longo, M. R. (2017). Guillain-Barré syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 16(1), 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.022>
- Estes, J. D., Wong, S. W., & Brenchley, J. M. (2018). Nonhuman primate models of human viral infections. *Nature reviews. Immunology*, 18(6), 390-404. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0005-7>
- Farooqi, A. A., Desai, N. N., Qureshi, M. Z., Librelotto, D. R. N., Gasparri, M. L., Bishayee, A., Nabavi, S. M., Curti, V., & Daglia, M. (2018). Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnology Advances*, 36(1), 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.010>
- Franz, A. W. E., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., & Clem, R. J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, 7(7), 3741-3767. <https://doi.org/10.3390/v7072795>
- Giraldo, M. I., Xia, H., Aguilera-Aguirre, L., Hage, A., van Tol, S., Shan, C., Xie, X., Sturdevant, G. L., Robertson, S. J., McNally, K. L., Meade-White, K., Azar, S. R., Rossi, S. L., Maury, W., Woodson, M., Ramage, H., Johnson, J. R., Krogan, N. J., Morais, M. C., ... Rajsbaum, R. (2020). Envelope protein ubiquitination drives

entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature*, 585(7825), 414-419.

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2457-8>

Gold, A. S., Feitosa-Suntheimer, F., Araujo, R. V., Hekman, R. M., Asad, S., Londono-Renteria, B., Emili, A., & Colpitts, T. M. (2020). Dengue Virus Infection of *Aedes aegypti* Alters Extracellular Vesicle Protein Cargo to Enhance Virus Transmission. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6609.

<https://doi.org/10.3390/ijms21186609>

Gómez-González, B., Hurtado-Alvarado, G., Esqueda-León, E., Santana-Miranda, R., Rojas-Zamorano, J. Á., & Velázquez-Moctezuma, J. (2013). REM sleep loss and recovery regulates blood-brain barrier function. *Current Neurovascular Research*, 10(3), 197-207. <https://doi.org/10.2174/15672026113109990002>

Greene, C., & Campbell, M. (2016). Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers*, 4(1), e1138017.

<https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1138017>

Gurunathan, S., Kang, M.-H., & Kim, J.-H. (2021). A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 1281-1312.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S291956>

Hadizadeh, N., Bagheri, D., Shamsara, M., Hamblin, M. R., Farmany, A., Xu, M., Liang, Z., Razi, F., & Hashemi, E. (2022). Extracellular vesicles biogenesis, isolation, manipulation and genetic engineering for potential in vitro and in vivo therapeutics: An overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.1019821>

- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 81(1), e00055-16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-16>
- Huang, Y., Li, Y., Zhang, H., Zhao, R., Jing, R., Xu, Y., He, M., Peer, J., Kim, Y. C., Luo, J., Tong, Z., & Zheng, J. (2018). Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discovery*, 4, 19. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0017-2>
- Johansson, M. A., Mier-y-Teran-Romero, L., Reefhuis, J., Gilboa, S. M., & Hills, S. L. (2016). Zika and the Risk of Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 375(1), 1-4. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1605367>
- Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P., Selvakumar, G., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S., & Zaheer, A. (2016). Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of neurology, neurosurgery and spine*, 1(1), 1003.
- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
- Kramer, L. D., & Ciota, A. T. (2015). Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Current Opinion in Virology*, 15, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.003>

- Krauer, F., Riesen, M., Reveiz, L., Oladapo, O. T., Martínez-Vega, R., Porgo, T. V., Haefliger, A., Broutet, N. J., & Low, N. (2017). Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS Medicine*, *14*(1), e1002203.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002203>
- Kutchy, N. A., Peeples, E. S., Sil, S., Liao, K., Chivero, E. T., Hu, G., & Buch, S. (2020). Extracellular Vesicles in Viral Infections of the Nervous System. *Viruses*, *12*(7), 700. <https://doi.org/10.3390/v12070700>
- Latysheva, N., Muratov, G., Rajesh, S., Padgett, M., Hotchin, N. A., Overduin, M., & Berditchevski, F. (2006). Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: Mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(20), 7707-7718.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00849-06>
- Lee, J. K., & Shin, O. S. (2019). Advances in Zika Virus–Host Cell Interaction: Current Knowledge and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5), 1101. <https://doi.org/10.3390/ijms20051101>
- Lin, H.-H., Yip, B.-S., Huang, L.-M., & Wu, S.-C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*, *36*(1), 47-53.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.004>
- 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. <https://doi.org/10.3390/cells9010123>

- Martins, S. de T., Kuczera, D., Lötvall, J., Bordignon, J., & Alves, L. R. (2018). Characterization of Dendritic Cell-Derived Extracellular Vesicles During Dengue Virus Infection. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01792>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9-17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Maximova, O. A., Faucette, L. J., Ward, J. M., Murphy, B. R., & Pletnev, A. G. (2009). Cellular Inflammatory Response to Flaviviruses in the Central Nervous System of a Primate Host. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(10), 973-989. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954180>
- Michinaga, S., & Koyama, Y. (2019). Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 571. <https://doi.org/10.3390/ijms20030571>
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421-443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
- Moser, L. A., Boylan, B. T., Moreira, F. R., Myers, L. J., Svenson, E. L., Fedorova, N. B., Pickett, B. E., & Bernard, K. A. (2018). Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(11), e0006880. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006880>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487-524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>

- Mustafá, Y. M., Meuren, L. M., Coelho, S. V. A., & de Arruda, L. B. (2019). Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 525.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00525>
- Nag, S. (2003). Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry. *Methods in Molecular Medicine*, *89*, 133-144.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-419-0:133>
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, *19*(12), 1584-1596.
<https://doi.org/10.1038/nm.3407>
- Olagnier, D., Muscolini, M., Coyne, C. B., Diamond, M. S., & Hiscott, J. (2016). Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. *DNA and Cell Biology*, *35*(8), 367-372. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3404>
- Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud. (2015). *Síndrome neurológico, anomalías congénitas e infección por virus Zika. Implicaciones para la salud pública en las Américas* (p. 12) [Alerta Epidemiológica]. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dic-1-cha-alerta-epi-zika-sindrome-neuro.pdf>
- Pant, S., Hilton, H., & Burczynski, M. E. (2012). The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology*, *83*(11), 1484-1494.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.037>
- Papa, M. P., Meuren, L. M., Coelho, S. V. A., Lucas, C. G. de O., Mustafá, Y. M., Lemos Matassoli, F., Silveira, P. P., Frost, P. S., Pezzuto, P., Ribeiro, M. R., Tanuri, A.,

- Nogueira, M. L., Campanati, L., Bozza, M. T., Paula Neto, H. A., Pimentel-Coelho, P. M., Figueiredo, C. P., de Aguiar, R. S., & de Arruda, L. B. (2017). Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2557.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02557>
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., & Amara, A. (2013). Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses*, *6*(1), 69-88. <https://doi.org/10.3390/v6010069>
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *The New England Journal of Medicine*, *374*(16), 1552-1563.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., & Petersen, L. R. (2016). Zika Virus and Birth Defects—Reviewing the Evidence for Causality. *The New England Journal of Medicine*, *374*(20), 1981-1987.
<https://doi.org/10.1056/NEJMs1604338>
- Reichelt, W. N., Waldschitz, D., Herwig, C., & Neutsch, L. (2016). Bioprocess monitoring: Minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *43*, 1271-1280. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1796-9>
- Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., De Jesús-González, L. A., Hurtado-Monzón, A. M., Farfan-Morales, C. N., Cervantes-Salazar, M., Bolaños, J., Cigarroa-Mayorga, O. E., Martín-Martínez, E. S., Medina, F., Fragoso-Soriano, R. J., Chávez-Munguía, B., Salas-Benito, J. S., & Del Angel, R. M. (2019). Isolation and characterization of exosomes released from mosquito cells infected with dengue virus. *Virus Research*, *266*, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.015>

- Rückert, C., & Ebel, G. D. (2018). How do virus-mosquito interactions lead to viral emergence? *Trends in parasitology*, 34(4), 310-321.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.12.004>
- Saiz, J.-C., Vázquez-Calvo, Á., Blázquez, A. B., Merino-Ramos, T., Escribano-Romero, E., & Martín-Acebes, M. A. (2016). Zika Virus: The Latest Newcomer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 496. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00496>
- Sánchez-González, J. M., Ramos-Remus, C., Jácome-Sánchez, B., García-Ortiz, R., Flores-Ramos, J., & Hernández, F. S. (2016). Virus Zika en México. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 63(1), 4-12.
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: How appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*, 9, 385.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385>
- Schultz, V., Cumberworth, S. L., Gu, Q., Johnson, N., Donald, C. L., McCanney, G. A., Barrie, J. A., Da Silva Filipe, A., Linington, C., Willison, H. J., Edgar, J. M., Barnett, S. C., & Kohl, A. (2021). Zika Virus Infection Leads to Demyelination and Axonal Injury in Mature CNS Cultures. *Viruses*, 13(1), 91.
<https://doi.org/10.3390/v13010091>
- Sharma, A., & Lal, S. K. (2017). Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Frontiers in Microbiology*, 8, 110.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110>
- Shi, Y., & Gao, G. F. (2017). Structural Biology of the Zika Virus. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(6), 443-456. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>

- Sims, B., Gu, L., Krendelchtchikov, A., & Matthews, Q. L. (2014). Neural stem cell-derived exosomes mediate viral entry. *International Journal of Nanomedicine*, *9*, 4893-4897. <https://doi.org/10.2147/IJN.S70999>
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(suppl_10), S935-S944. <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. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. (2021). *Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por Virus del Zika por Entidad Federativa* (18; p. 5). Secretaría de Salud. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/637925/CuadroCasosZikayEmb_SE18_2021.pdf
- Sun, H., Chen, Q., & Lai, H. (2017). Development of Antibody Therapeutics against Flaviviruses. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*. <https://doi.org/10.3390/ijms19010054>
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological Reviews*, *99*(1), 21-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. 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.

<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Torres, A. (2017). *Enfermedad por virus de Zika y sus complicaciones neurológicas*. 46(2), 41-45.

Tsunoda, I., Omura, S., Sato, F., Kusunoki, S., Fujita, M., Park, A.-M., Hasanovic, F., Yanagihara, R., & Nagata, S. (2016). Neuropathogenesis of Zika Virus Infection: Potential Roles of Antibody-Mediated Pathology. *Acta medica Kinki University*, 41(2), 37-52.

Uncini, A., Shahrizaila, N., & Kuwabara, S. (2017). Zika virus infection and Guillain-Barré syndrome: A review focused on clinical and electrophysiological subtypes. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 88(3), 266-271.

<https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-314310>

Vora, A., Zhou, W., Londono-Renteria, B., Woodson, M., Sherman, M. B., Colpitts, T. M., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2018). Arthropod EVs mediate dengue virus transmission through interaction with a tetraspanin domain containing glycoprotein Tsp29Fb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(28), E6604-E6613.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1720125115>

Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>

Zhou, W., Woodson, M., Neupane, B., Bai, F., Sherman, M. B., Choi, K. H., 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 neuronal cells. *PLoS Pathogens*, *14*(1), e1006764. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006764>

Zhou, W., Woodson, M., Sherman, M. B., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2019). Exosomes mediate Zika virus transmission through SMPD3 neutral Sphingomyelinase in cortical neurons. *Emerging Microbes & Infections*, *8*(1), 307-326. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1578188>