



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Participación de la tetraspanina CD81 durante la infección del virus  
Dengue”**

T E S I S

Que presenta

**Biól. Magda Lizbeth Benítez Vega**

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de tesis:

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

Ciudad de México

Agosto 2022

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca con número de registro 776082, en el Laboratorio 8 de Virología, del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres.

## Contenido

1. Introducción.....	5
1.1 Dengue .....	5
1.2 Biología del DENV .....	6
1.3 Ciclo replicativo.....	7
1.4 Exosomas .....	9
Generalidades .....	9
Biogénesis.....	10
Participación de los exosomas en la propagación de DENV y otros virus	11
1.5 Tetraspaninas .....	13
1.5.1 CD81 en infecciones virales .....	16
1.5.2 CD81 en la captación de exosomas .....	16
2. Justificación.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivo general .....	20
Objetivos específicos .....	20
5. Estrategia experimental.....	21
6. Materiales y métodos .....	22
6.1 Microscopía confocal .....	22
6.2 Análisis por Western blot de CD81 .....	22
6.3 Neutralización de CD81 previo a la infección por DENV2 en cultivos Huh-7 .....	23
6.4 Cultivo celular e infección de células C6/36.....	23
6.5 Aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas .....	24
6.6 Caracterización de exosomas.....	25

6.7	Ensayo de inactivación de partículas virales libres .....	25
6.8	Captación de exosomas por las células C6/36 y Huh-7 .....	26
6.9	Neutralización de CD81 previo a la interacción de los exosomas con células Huh-7 .....	27
6.10	Ensayo de placas .....	27
7.	Resultados .....	28
7.1	El anticuerpo anti-CD81 reconoce la tetraspanina en células Huh-7	28
7.2	La neutralización de CD81 en Huh-7 disminuye la infección por DENV2 .....	29
	.....	31
7.3	Aislamiento y caracterización de SEVs.....	32
7.4	Las SEVs de C6/36 son captadas por células de mosquito C6/36 y células de humano Huh-7 .....	33
7.5	Purificación de exosomas provenientes de células infectadas e inactivación de partículas virales libres .....	36
7.6	La neutralización de CD81 en Huh-7 inhibe la captación de SEVs de C6/36 infectadas con DENV2.....	38
8.	Discusión.....	41
9.	Conclusiones.....	47
10.	Perspectivas .....	48
	Referencias.....	49

## 1. Introducción

### 1.1 Dengue

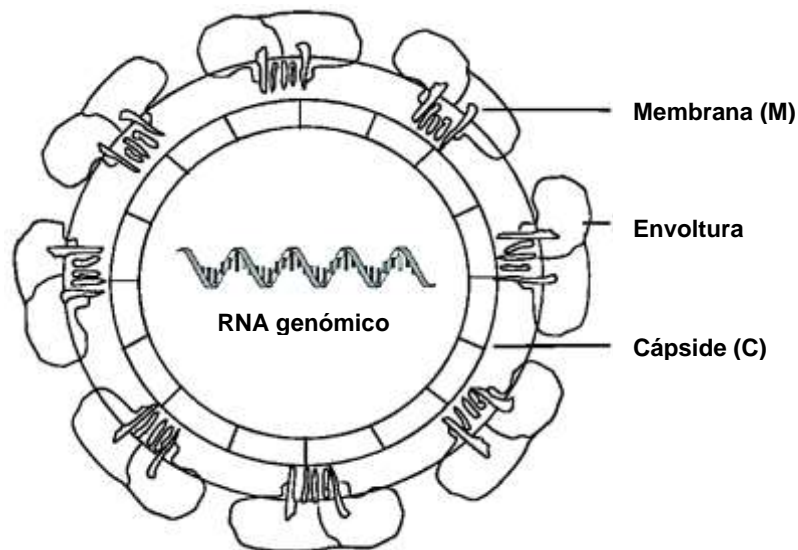
El virus del Dengue (DENV) es considerado uno de los más importantes agentes infecciosos en la salud pública, principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo. El dengue es una enfermedad presente en más de cien países y se estima que existen aproximadamente 390 millones de casos cada año a nivel mundial, de los cuales 96 millones presentan distintos niveles de gravedad (OMS, Organización Mundial de la Salud, s/f). Además, se considera una enfermedad infecciosa desatendida, la cual no cuenta con un tratamiento específico ni con una vacuna altamente eficaz (Vanlerberghe & Verdonck, 2014). En México, el dengue es uno de los problemas de salud más relevantes. En la semana epidemiológica número 23 del 2022, se han registrado 1240 casos confirmados acumulados, de los cuales 711 son de dengue no grave, 475 presentan signos de alarma y 54 son casos de dengue severo. Los estados con mayor incidencia de casos confirmados son Morelos, Colima, Guerrero, Veracruz y Oaxaca (SINAVE/DGE/SSA, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, s. f.).

DENV pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y presenta cuatro serotipos (DENV1-DENV4). Es transmitido al humano mediante la picadura de hembras del mosquito vector del género *Aedes* (ICTV, s. f.; Velandia & Castellanos, 2011). La infección por un serotipo en particular, puede producir inmunidad contra dicho serotipo, sin embargo, una reinfección por un serotipo distinto, puede inducir la forma grave de la enfermedad (Arredondo-García et al., 2020). De acuerdo con la OMS, la enfermedad se clasifica en dengue no grave y dengue grave y una subcategoría dentro del dengue no grave llamada dengue con signos de alarma (OMS, Organización Mundial de la Salud, s. f.). Algunos de los síntomas que se presentan en el dengue no grave son fiebre de hasta 40° C, cefalea, erupciones en la piel, dolores musculares y de articulaciones. Si bien, la mayoría de los casos

presenta una recuperación total después de siete días, algunos otros evolucionan a dengue grave el cual se caracteriza por un incremento en la permeabilidad vascular, pérdida de plasma y hemorragias pleurales y gastrointestinales lo cual incrementa el riesgo de muerte en caso de no ser atendido (Torres-Galicia & Cortés-Poza, 2014).

## 1.2 Biología del DENV

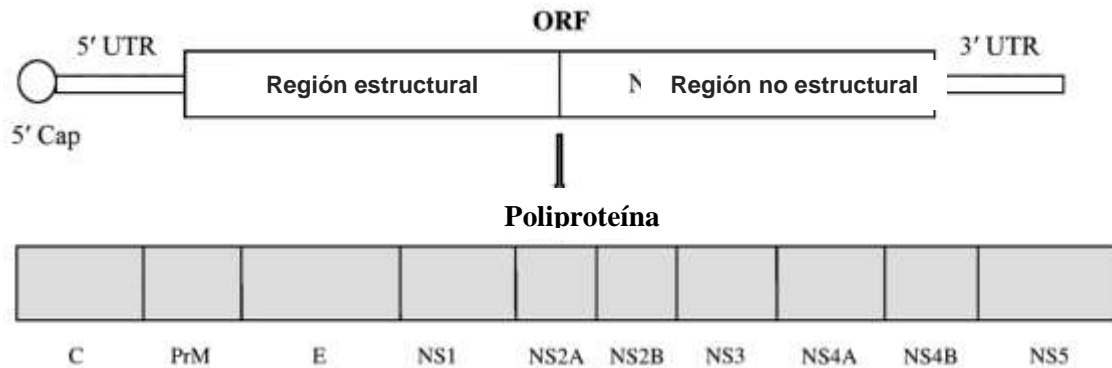
Las partículas virales de DENV son esféricas, de simetría icosaédrica, con un diámetro de aproximadamente 50 nm, contienen una capa externa de proteínas ancladas a una bicapa lipídica de origen reticular que envuelve la nucleocápside interna (figura 1) (Kuhn et al., 2002).



**Figura 1. Virión de DENV con sus proteínas estructurales.** La proteína de membrana, la de envoltura y la proteína de la Cápside. Modificado de Roy & Bhattacharjee, 2021.

DENV tiene como genoma una molécula de RNA monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 11 Kb el cual se conforma por la región 5' UTR (Región No Traducida) de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, un marco de lectura abierto (ORF) y la 3' UTR con una longitud aproximada de 400 nucleótidos dependiendo del serotipo (Finol & Ooi, 2019; Ng et al., 2017) (figura 2). El RNA viral en su extremo 5' tiene una estructura de cap tipo 1 y

carece de poliadenilación en el extremo 3'. Al entrar a la célula hospedera, el RNA es traducido directamente a una poliproteína que se escinde para dar origen a las tres proteínas estructurales cápside (C), membrana (pr-M) y envoltura (E) (figura 1), y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) necesarias para llevar a cabo la replicación del virus (figura 2) (Kuhn et al., 2002; Roy & Bhattacharjee, 2021).



**Figura 2. Organización genómica de DENV.** Se representan las tres regiones principales del genoma y la organización de los genes que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales. Modificado de Roy & Bhattacharjee, 2021.

### 1.3 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo de DENV sucede de manera similar en células de mosquito y células de mamífero (Reyes-Ruiz, 2019). En el caso del mosquito vector, la replicación viral ocurre inicialmente en las células del intestino medio y se extiende a diversos órganos hasta alcanzar las glándulas salivales, en las cuales se lleva a cabo la transmisión al hospedero vertebrado (Choy et al., 2015). En el caso del hospedero vertebrado, la replicación viral comienza en células dendríticas, macrófagos y monocitos (Roy & Bhattacharjee, 2021).

De manera general, el ciclo replicativo comienza con la entrada del virus a través de la interacción de la proteína viral E y las proteínas de la superficie de la célula, lo cual genera la internalización por endocitosis. Hasta la fecha, no se ha identificado un receptor específico para el DENV, es decir, el virus puede reconocer, adherirse e interactuar con diversas moléculas, tales como

Heparán Sulfato, DC-SIGN, CD14, HSP90, HSP70, receptor de unión a manosa, GRP-78, TIM-1, AXL, entre otras descritas en distintas células de humano (Cordero-Rivera et al., 2021; Cruz-Oliveira et al., 2015). Esto le confiere al virus la capacidad de infectar un gran número de células, como las epiteliales, fibroblastos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T y hepatocitos (Nanaware et al., 2021).

Una vez internalizado el virus mediante endocitosis, se lleva a cabo la formación de endosomas tardíos los cuales se acidifican para promover la fusión de la membranas viral y celular y la liberación de la nucleocápside en el citoplasma, así como del genoma viral, el cual comienza la traducción de las proteínas virales necesarias para la replicación y el ensamblaje del virus (Cruz-Oliveira et al., 2015; Roy & Bhattacharjee, 2021).

La replicación y la traducción viral del RNA están estrechamente relacionada con las membranas intracelulares del retículo endoplásmico, en donde se forman los complejos de replicación, en los cuales las proteínas virales pr-M y E se anclan a la membrana (Welsch et al., 2009). Una vez que el genoma ha sido replicado, este se asocia a la proteína C para formar la nucleocápside y en el retículo obtiene las proteínas M y E (Nanaware et al., 2021; Roy & Bhattacharjee, 2021). La maduración de las partículas virales dependen de un pH celular bajo (5.8-6) y de los cambios conformacionales de la proteína E, así como el corte del péptido de la Pr-M, que determina el estado infeccioso del virus, este proceso ocurre en el paso a través del aparato de Golgi (Perera & Kuhn, 2008). Las partículas virales maduras rodeadas por una membrana viajan a la periferia de la membrana celular en donde se fusionan y son liberadas al espacio extracelular (Nanaware et al., 2021)

En los últimos años, se ha reportado que algunos virus explotan la vía exosomal para su diseminación, un mecanismo novedoso de propagación, en donde se transportan proteínas y ácidos nucleicos virales en estructuras



membranosas que no son detectadas por el sistema inmune, favoreciendo la dispersión de la infección (Khan et al., 2017)

## 1.4 Exosomas

### Generalidades

Las vesículas extracelulares son partículas liberadas de la célula que están delimitadas por una doble membrana lipídica, sin la capacidad de replicarse (Théry et al., 2018). Se han clasificado de acuerdo a su tamaño, densidad, contenido, origen y mecanismo de liberación, como cuerpos apoptóticos, microvesículas o ectosomas y nanovesículas o exosomas (tabla 1) (Doyle & Wang, 2019; Gurung et al., 2021; Meldolesi, 2018).

**Tabla 1. Características de vesículas extracelulares** (Modificado de Gurung et al., 2021).

Características	Exosomas	Microvesículas	Cuerpos apoptóticos
Origen	Endocítico	Membrana plasmática	Muerte celular
Tamaño	30-200 nm	100-1000 nm	> 1000 nm
Densidad	1.13-1.19 g/mL	1.04-1.07 g/mL	1.16-1.28 g/mL
Forma	Esferoide	Irregular	Variable

**Tabla 2. Composición de los exosomas y sus funciones** (Gurung et al., 2021).

Proteínas	Funciones	
Tetraspaninas	CD9, CD63, CD82, CD81, CD37, CD53	Biogénesis de exosomas, selección de moléculas cargo, selección de células blanco y captación
ESCRT	Alix, TSF-101	Biogénesis de exosomas
Proteínas de Choque Térmico	Hsp90, Hsc70, Hsp60	Secreción de exosomas y señalización
Complejo principal de histocompatibilidad	MHC-Clase I, MHC-Clase II	Presentación de antígeno
Proteínas de citoesqueleto	Actina, Cofilina, Tubulina	Biogénesis de exosomas y secreción
Proteínas de adhesión	Integrina- $\alpha$ - $\beta$ , P-selectina	Selección de células blanco y captación
Lípidos	Funciones	
Colesterol	Secreción de exosomas	
Ceramidas	Secreción de exosomas y selección de moléculas cargo	
Esfingomielinas	Rigidez de los exosomas y señalización	

Fosfatidilserina	Formación de exosomas, señalización y captación
Fosfatidilcolina	Formación de exosomas y estructura
Fosfatidiletanolamina	Formación de exosomas y estructura
Fosfatidilinositol	Formación de exosomas y estructura
Gangliosidos	Rigidez de los exosomas

Los exosomas son vesículas de origen endosomal, que miden entre 30 y 200 nm de diámetro y presentan doble membrana. En su interior, contienen moléculas cargo como proteínas, lípidos, micro RNAs, RNAs mensajeros (RNAm), metabolitos, que al ser entregadas a la célula blanco, pueden activarla, diferenciarla, infectarla, o bien, llevarla a apoptosis. Esto hace que los exosomas sean una vía importante de comunicación intercelular, además de regular algunos procesos fisiológicos y patológicos (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Algunas de las proteínas que componen a los exosomas son las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), las proteínas Alix, TSG101, integrinas, proteínas de choque térmico (Hsp), actina y flotillinas. Por otra parte, la doble membrana está compuesta por lípidos como la esfingomielina, el colesterol y las ceramidas, que pueden influir en la selección de las moléculas cargo, la secreción de exosomas y la señalización (tabla 2) (Gurung et al., 2021; Kowal et al., 2014).

### **Biogénesis**

La formación de los exosomas comienza con la invaginación de la membrana plasmática que genera a los endosomas. Estos son llevados desde la membrana plasmática hasta el centro de la célula, donde ocurre la invaginación de la membrana dando como resultado la generación de vesículas intraluminales (ILVs) dentro de los cuerpos multivesiculares (MVBs). Esto se lleva a cabo mediante tres vías descritas: la vía del ESCRT, la vía de las ceramidas y la vía de las tetraspaninas (Aheget et al., 2020; McKelvey et al., 2015). Posteriormente, los MVBs, son transportados a las inmediaciones de la membrana celular por medio de la red del citoesqueleto, donde

finalmente se fusionan las membranas y se secretan las ILVs como exosomas (Anderson et al., 2018; Gurung et al., 2021).

Una vez liberados, los exosomas pueden ser captados e internalizados por las células receptoras e inducir cambios fisiológicos o patológicos mediante la interacción con los receptores de superficie, o bien por la liberación de las moléculas cargo (Kwok et al., 2021). Se han propuesto tres pasos en la captación de los exosomas: la selección de la célula blanco, la internalización y la entrega de las moléculas cargo (Mathieu et al., 2019). La captación e internalización de los exosomas dependerán del tipo de célula y de las proteínas de superficie tanto de los exosomas como de las células blanco. Se han descrito distintos mecanismos de internalización como la fusión de la membrana del exosoma con la membrana celular, la endocitosis dependiente de clatrina, la endocitosis mediada por caveolina, la macropinocitosis, o la fagocitosis, la mediada por balsas lipídicas; sin embargo, la endocitosis es considerada el proceso más común (McKelvey et al., 2015; Mulcahy et al., 2014). En diversos ensayos de captación, se ha reportado que es un mecanismo el cual requiere energía y que depende de la cantidad de exosomas y del tiempo de interacción con las células receptoras (Jurgielewicz et al., 2020).

### **Participación de los exosomas en la propagación de DENV y otros virus**

En los últimos años, se ha estudiado la importancia de los exosomas derivados de células de mamífero en infecciones bacterianas, parasitarias y virales, pues este mecanismo puede funcionar como una estrategia del patógeno para diseminar la infección sin alertar al sistema inmune (Sultana & Neelakanta, 2020).

Se ha estudiado la participación de los exosomas en la propagación y patología de diversos virus, como en HTLV-1 (virus linfotrópico de las células t humanas tipo 1), en donde se encontró la presencia de exosomas que

contienen proteínas virales en el fluido cerebroespinal de pacientes, lo que puede desencadenar una respuesta inmune como la inflamación (Anderson et al., 2018). En la infección por el VHC (virus de la hepatitis c), se ha reportado la presencia de exosomas con proteínas virales y genomas completos con capacidad infectiva (Longatti et al., 2015; Ramakrishnaiah et al., 2013). En el caso del VIH-1 (Virus de la inmunodeficiencia humana 1), se ha reportado que mediante exosomas, las células dendríticas transmiten partículas virales infecciosas a los linfocitos T (Wiley & Gummuluru, 2006). En la infección con Herpesvirus-6, induce la formación de MVB y el virus se libera mediante la vía exosomal (Mori et al., 2008). En el caso de ZIKV (virus del Zika), se encontraron RNA y proteínas virales en exosomas derivados de células de mosquito y células neuronales (Martínez-Rojas et al., 2020; Zhou et al., 2019) y recientemente en la infección por SARS-CoV-2 (coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2), se encontró que los exosomas transfieren receptores como ACE-2 y CD9, haciendo a las células no infectadas más susceptibles a la infección (Hassanpour et al., 2020).

De manera particular, Vora y col. (2018) reportaron que cultivos celulares derivados de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* infectados con DENV, secretan vesículas extracelulares, que contienen proteínas y RNA viral infeccioso para las células de mosquitos y mamíferos sin infectar (tabla 3).

Reyes-Ruiz y col. (2019) mencionan además, que los exosomas derivados de las células de mosquito infectadas con DENV presentan un mayor tamaño en comparación con los secretados por células no infectadas, además, identificaron la presencia de partículas similares a virus en algunos de los exosomas liberados y también confirmaron su capacidad infectiva en células C6 / 36 (tabla 3).

**Tabla 3. Componentes virales asociados a los exosomas secretados por células de mosquito infectadas por dengue**

Componentes virales	Referencia
Genoma viral completo	(Vora et al., 2018)
Proteína E	(Vora et al., 2018)
NS1	(Vora et al., 2018)
Partículas similares a virus	Reyes-Ruiz et al., 2019
NS3	Gallardo, 2020

En los exosomas derivados de los cultivos celulares de mosquito infectados con DENV, se han identificado proteínas homólogas a las tetraspaninas humanas CD9, CD63 y CD81, y la proteína de choque térmico HSP70, así como la interacción de la tetraspanina Tsp29Fb con la proteína E del dengue, sin embargo su función en la biogénesis y en la captación de los exosomas por las células blanco aun es desconocida (tabla 4) (Reyes-Ruiz et al., 2019; Vora et al., 2018).

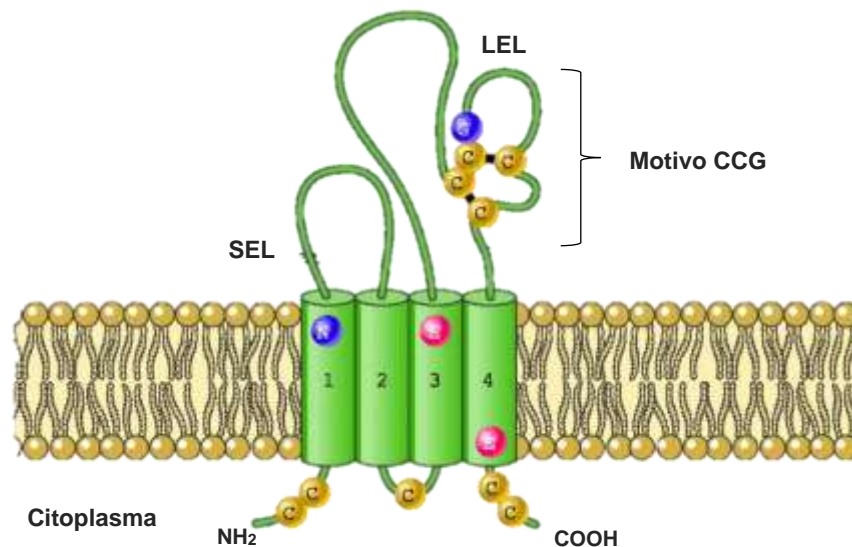
**Tabla 4. Proteínas celulares de mosquito relacionadas con la biogénesis de los exosomas**

Proteínas celulares de mosquito	Ortólogo a humano	Referencia
Tsp29fb	CD63	Vora et al., 2018
Hsp70	Hsp70	(Vora et al., 2018)
AalCD9	CD9	(Reyes-Ruiz et al., 2019)
AalCD81	CD81	(Reyes-Ruiz et al., 2019)
Alix	Alix	(Reyes-Ruiz et al., 2019)

### 1.5 Tetraspaninas

Los exosomas se caracterizan por estar enriquecidos con ciertas proteínas, un grupo de ellas son las tetraspaninas las cuales han sido utilizadas como marcadores de este tipo de vesículas extracelulares. Entre las tetraspaninas que se han reportado en los exosomas están la CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151, aunque difieren según el tipo celular del que se originan. Están altamente conservadas a lo largo de la evolución y se encuentra de manera

general en las células eucariotas, presentan una baja homología de secuencia aunque conservan la estructura secundaria y terciaria. Estas proteínas funcionan como andamios moleculares y tienen un papel importante en la adhesión, motilidad, fusión de membranas, transducción de señales y activación celular.(Andreu & Yáñez-Mó, 2014; McKelvey et al., 2015; Reyes et al., 2018).



**Figura 3. Componentes estructurales de las tetraspaninas.** Se representa el asa extracelular grande (LEL), el asa extracelular pequeña (SEL), las dos colas intracelulares y el asa intracelular pequeña en motivo cisteína-cisteína-glicina (Modificado de Levv & Shoham. 2005).

Las tetraspaninas se caracterizan por tener cuatro dominios transmembranales, dos colas intracelulares –N y -C terminal, un bucle intracelular pequeña y dos dominios extracelulares en forma de bucle, uno grande y uno pequeño (LEL y SEL, respectivamente). El LEL se considera la región más variable entre las tetraspaninas, sin embargo, contiene un motivo CCG (cisteína-cisteína-glicina) y otro motivo CC (cisteína-cisteína), ambos altamente conservados que promueven la formación de puentes disulfuro, los cuales mantienen la estructura tridimensional de este dominio que se conservan entre estas proteínas (figura 3) (Levy & Shoham, 2005; Reyes et al.,

2018; Termini & Gillette, 2017). Existen una gran cantidad de estudios centrados en el LEL debido a su funcionalidad, por ejemplo, se ha reportado que la región hidrofóbica conservada dentro de este bucle, está involucrada en la homodimerización de la tetraspanina CD81.

Por otro lado, también se sugiere que la región más variable dentro de LEL puede interactuar con otras proteínas específicas para cada tetraspanina, no obstante, no se descarta la posibilidad de que ambos subdominios puedan interactuar de manera simultánea (Seigneuret et al., 2001; Stipp et al., 2003).

Los dominios transmembrana, a diferencia del LEL, presenta un alto grado de conservación y es la región principal en la cual se lleva a cabo la interacción entre las tetraspaninas debido a que son dominios altamente hidrofóbicos, organizando amplios complejos de diversas proteínas. Por otro lado, las colas terminales y el bucle intracelular son divergentes entre distintas tetraspaninas, lo que sugiere una función distinta para cada una (Stipp et al., 2003).

Se han identificado diferentes interacciones de las tetraspaninas, como la asociación lateral específica con otras proteínas, la asociación entre las mismas tetraspaninas, y la asociación con lípidos como el colesterol (Jankovičová et al., 2020). Gracias a estas interacciones, las tetraspaninas son capaces de formar Microdominios Enriquecidos de Tetraspanina (TEM por sus siglas en inglés), que contienen lípidos específicos y otras proteínas de membrana, de citoesqueleto y de señalización citosólicas (Andreu & Yáñez-Mó, 2014; Yáñez-Mó et al., 2009). Esto permite una comunicación más eficiente, necesaria para una mejor transducción de señales desde un estímulo extracelular hasta las cascadas de señalización intracelular (Kummer et al., 2020). Debido a su amplia gama de interacciones, las tetraspaninas y los TEM, han sido ampliamente estudiados en los procesos de entrada en infecciones virales.

### **1.5.1 CD81 en infecciones virales**

La tetraspanina CD81 es una proteína con un peso molecular de 26 kDa la cual tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas formando heterodímeros y consigo misma, formando homodímeros (New et al., 2021).

Se ha demostrado que los TEM enriquecidos con las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, albergan a los receptores de distintos coronavirus, como el ACE-2 del SARS-CoV y el DPP4 del MERS-CoV, sugiriendo a estos microdominios como “facilitadores” del acceso del virus a su receptor. Además, demostraron que con el uso de anticuerpos dirigidos a CD9 y CD81 se reduce la infección por coronavirus e influenza A de baja patogenicidad (Earnest et al., 2015). En el caso del VHC, se ha descrito la interacción directa de CD81 con la glicoproteína E2, lo cual activa una cascada de señalización que culmina en la entrada del virus (Florin & Lang, 2018). Por otro lado, la replicación del DNA del Virus del Herpes Simple 1 (HSV-1), se ve alterada en células *knock out* CD81, sugiriendo su participación en el proceso (Benayas et al., 2020). En el estudio del virus del Chikungunya (CHIKV), se reportó que la replicación viral está fuertemente asociada con CD81 debido a la capacidad de unión que tienen con el colesterol, (Lasswitz et al., 2022). Estos hallazgos, refuerzan la importancia de las interacciones de las tetraspaninas con otras moléculas para las distintas etapas de las infecciones virales.

### **1.5.2 CD81 en la captación de exosomas**

Las tetraspaninas en los exosomas, tienen diversas funciones pueden estar involucradas en el empaquetamiento de moléculas cargo, en la selección de las células receptoras, así como en su captación (Rana & Zöller, 2011), . Por ejemplo, se ha reportado que al tratar células dendríticas con anticuerpos anti-CD9 y anti-CD81 de manera simultánea, se reduce la captación de los exosomas, lo que sugiere que estas proteínas están involucradas en la internalización de los exosomas (Morelli et al., 2004). También, se ha



observado que el VIH-1 se une a los exosomas mediante TIM-4 y que las tetraspaninas CD9 y CD81 facilitan la entrada celular del complejo virus-exosoma, participando en la propagación del virus y que la adición del anticuerpo anti-CD81 disminuye significativamente la expresión de un gen viral (Sims et al., 2018).

## **2. Justificación**

Los exosomas juegan un papel importante en la comunicación intercelular y la entrega de moléculas cargo. Estas vesículas han sido propuestas como una vía de propagación de la infección por DENV en líneas celulares de mosquito y de mamífero, sugiriendo la captación de exosomas como un posible mecanismo de entrada viral alternativo. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos involucrados en la captación e internalización de los exosomas y su participación en la infección del DENV.

Se ha demostrado que las tetraspaninas tienen un papel importante en la entrada viral y de exosomas. Por lo tanto es de suma importancia analizar la participación de la tetraspanina CD81 en el proceso de entrada viral mediada por receptor y en la captación de exosomas provenientes de células infectadas con DENV.

### **3. Hipótesis**

La tetraspanina CD81 de células Huh-7 participa en la entrada del virus y en la captación de exosomas provenientes de células infectadas con DENV2.

#### **4. Objetivo general**

Analizar la participación de la tetraspanina CD81 de células Huh-7 en la entrada del DENV2 y en la captación de exosomas en células Huh7.

#### **Objetivos específicos**

- Determinar la participación de CD81 de células de mamífero Huh7 en el proceso de entrada del DENV2
- Aislar y caracterizar los exosomas provenientes de los sobrenadantes de células de mosquito C6/36
- Evaluar la captación de exosomas en células de mosquito C6/36 y de mamífero Huh-7
- Analizar la participación de CD81 de células Huh-7 en la captación de exosomas provenientes de células C6/36 infectadas con DENV2

## 5. Estrategia experimental

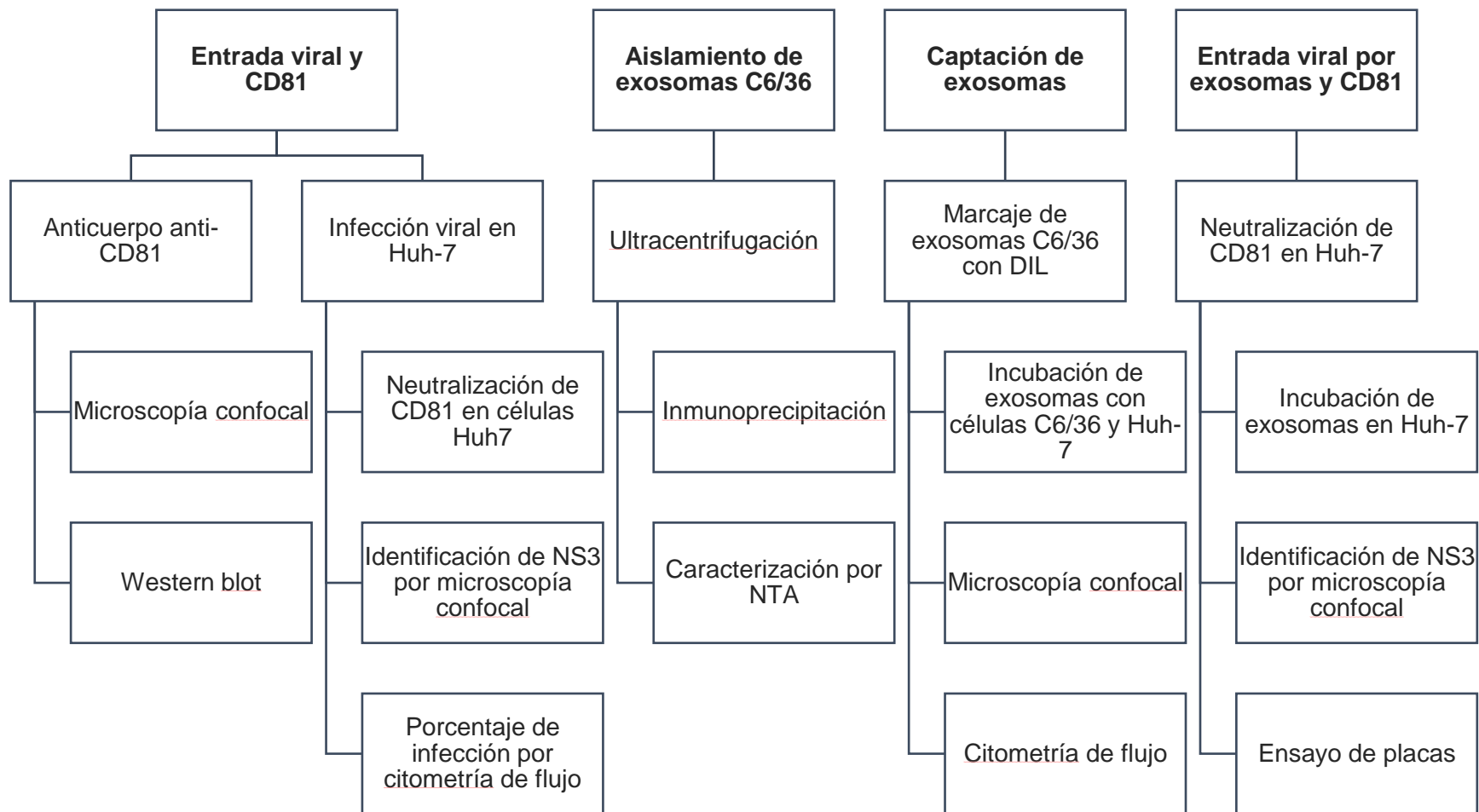


Figura 4. Estrategia Experimental.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Microscopía confocal**

Se sembraron células Huh-7 sobre laminillas y por 24 horas, después se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 30 minutos y se permeabilizaron con solución permeabilizadora (PBS 1x con saponina al 0.2 % y suero fetal bovino al 0.1%). Se incubó con el anticuerpo primario en una dilución 1:300 durante toda la noche a 4° C, se lavó 3 veces con solución permeabilizadora y se incubó el anticuerpo secundario acoplado a Alexa-488 por dos horas a 37° C. se lavó tres veces y se agregó Hoescht en una dilución 1:1000 en PBS 1x. Se lavó 3 veces con PBS 1x y se montó en un portaobjetos utilizando el medio de montaje Vectashield. Las laminillas fueron observadas en el microscopio confocal Leica SP8 del Laboratorio de Microscopía Confocal. Para determinar la especificidad del anticuerpo que reconoce la tetraspanina CD81 en células Huh-7, se utilizó el anticuerpo comercial anti-CD81 e ratón (B-11)(sc-166029).

### **6.2 Análisis por Western blot de CD81**

Se partió de cultivos celulares de 24 horas, de los cuales se extrajeron las proteínas mediante un lisado con la solución de RIPA 1x. Las proteínas obtenidas cuantificadas utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay y se sometieron 30 µg de proteína a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 %. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 volts por 70 minutos, la cual posteriormente se bloqueó con leche descremada al 10 % durante 1 hora. Se lavó con PBS 1x con tritón al 0.01 % y se incubó con el anticuerpo anti-CD81 a una dilución 1:500. Se realizaron tres lavados sucesivos con PBS 1x tritón al 0.01 % por 5 minutos cada uno. El anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP, se preparó en una dilución 1:5000 en PBS 1x tritón al 0.01 % y al 5 % de leche descremada y se incubaron junto con la membrana en agitación suave durante 1 h. Se realizaron tres lavados para quitar el exceso de anticuerpo y finalmente, se agregó luminol y peróxido en una proporción 1:1 para revelar las bandas.

### **6.3 Neutralización de CD81 previo a la infección por DENV2 en cultivos Huh-7**

Para determinar la participación de la tetraspanina CD81 en la entrada de DENV2, se realizaron ensayos de neutralización mediante el uso de anticuerpos específicos en células de hepatocarcinoma humano, Huh-7.

Se sembraron células sobre laminillas para microscopía confocal y sin ellas, para citometría de flujo en placas de 24 pozos. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD81 por 2 h a una dilución 1:300 en medio de cultivo sin suero. Se retiró el medio y se infectó el cultivo con DENV-2 utilizando una MOI de 1 por 24 h.

Posterior al tiempo de infección, las células se fijaron y permeabilizaron como se describió anteriormente. Para determinar el porcentaje de infección viral por citometría, se utilizó el anticuerpo monoclonal 2H2 que reconoce la proteína Pr-M en una dilución 1:50 y el anticuerpo secundario acoplado al fluoroforo Alexa-488. Las células fueron analizadas en el citómetro Fortessa BD.

Para determinar la infección por microscopía confocal, se utilizaron los anticuerpos anti-NS3 en una dilución 1:300 y 2H2 en una dilución 1:50. Posteriormente se agregaron los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa-555 y Alexa-488 respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con el reactivo Hoescht a una dilución 1:1000. Las laminillas se montaron en el portaobjetos con el medio de montaje Vectashield y observados por el microscopio confocal Leica SP8.

### **6.4 Cultivo celular e infección de células C6/36**

El aislamiento de los exosomas, se realizó en la línea celular C6/36 proveniente de larvas del mosquito *Ae. albopictus*, sembradas en frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Se realizaron dos condiciones, células infectadas y no infectadas. Las células se incubaron por 48 h en medio MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) depletado de vesículas extracelulares y se recuperó el sobrenadante. La infección viral se llevó a cabo mediante la inoculación de DENV2 a una MOI de 0.001 durante 2 h en células con una confluencia al 70

% en medio sin SFB. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo suplementado con suero depletado de vesículas extracelulares y se incubó durante 48 h a 28° C. A continuación, se recolectó el sobrenadante para aislar los exosomas por el método de ultracentrifugación (Reyes-Ruiz et al., 2019).

El porcentaje de infección se determinó mediante citometría de flujo, marcando la proteína Pr-M con el anticuerpo 2H2 a una dilución de 1:50.

### **6.5 Aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas**

El aislamiento de las SEVs se realizó a partir del sobrenadante de las células C6/36 infectadas con DENV2 y no infectadas incubadas por 48 h. Se realizó una centrifugación a 900 g por 10 minutos a 4° C para eliminar las células viables. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 2000 g por 10 minutos a 4° C para eliminar restos celulares. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 10000 g por 60 minutos a 4° C para precipitar las vesículas extracelulares grandes y se hizo pasar por un filtro de 0.22 µm. El sobrenadante resultante se hizo pasar por un filtro de 0.22 µL y se ultracentrifugó a 120000 g por 80 minutos para precipitar los SEVs. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido con 1 mL de PBS estéril a 4 °C. Se agregó 1 mL del *Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen Life Technologies)* y se incubó durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 10000 g por 70 minutos. La pastilla se resuspendió en 200 µL de PBS 1x ultracentrifugado o 50 µL de RIPA para Western Blot.

Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su uso (Martínez-Rojas et al., 2020; Reyes-Ruiz et al., 2019). Las vesículas precipitadas en este paso se emplearon para los ensayos de captación de exosomas en células C6/36y Huh-7.

Para la purificación de los exosomas, se inmunoprecipitaron empleando las perlas magnéticas *Dynabeads* acopladas con el anticuerpo anti-CD81 de ratón (B-11) (sc-166029) en una dilución 1:40. En un tubo limpio, se agregaron 50 µL de perlas magnéticas y se acercó el imán durante 5 minutos. Se retiró el



sobrenadante y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de muestra, se homogenizó con pipeteo suave y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente homogenizando para evitar que las perlas se precipiten. Pasado el tiempo de incubación, se colocó el tubo en el imán y se retiró el sobrenadante, el cual contiene la fracción viral y las vesículas extracelulares no acopladas a las perlas. La fracción precipitada se compone del complejo perlas-anti-CD81-exosomas a la cual se le añadió el buffer de elución (glicina ácida) para disociar el complejo e inactivar las posibles partículas virales libres que hayan quedado y recuperar los exosomas, los cuales también fueron analizados por NTA (Martínez-Rojas et al., 2020; Reyes-Ruiz et al., 2019).

### **6.6 Caracterización de exosomas**

Se evaluó la concentración y tamaño de los exosomas obtenidos mediante un análisis de rastreo de nanopartículas (Martínez-Rojas et al., 2020). Los exosomas se diluyeron 1:100 en PBS 1x estéril y se analizaron en las siguientes condiciones: se utilizó el láser de 488 nm, se realizaron tres capturas por 30 s cada una, una ganancia de 8 y un nivel de cámara de 9.

### **6.7 Ensayo de inactivación de partículas virales libres**

Para determinar si la glicina ácida es un tratamiento suficiente para inactivar las partículas virales libres que hayan quedado después de la inmunoprecipitación de los exosomas, se realizó el siguiente ensayo. A partir de 200  $\mu\text{L}$  de stock viral, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de glicina ácida (pH 3.0) y se resuspendió por pipeteo durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de Tris para nivelar el pH a 7.4. El volumen final se diluyó en medio sin suero y se incubó por 2 h en células Huh-7. Pasado este tiempo, se retiró el volumen, se agregó medio completo y se incubaron las células por 24 h. El mismo tratamiento fue realizado en los sobrenadantes resultantes de las perlas, el cual contiene partículas virales libres y vesículas extracelulares pequeñas no acopladas a las perlas, para determinar la viabilidad de las vesículas, así como de los componentes virales después del tratamiento con glicina ácida.

## **6.8 Captación de exosomas por las células C6/36 y Huh-7**

Para observar el proceso de captación e internalización de los exosomas provenientes de las células C6/36 en células de mamífero Huh-7 y en las mismas C6/36, las células se analizaron mediante microscopía confocal y citometría de flujo.

Las nanovesículas precipitadas por ultracentrifugación, fueron marcadas con el reactivo DIL, marcador lipofílico de membranas, de acuerdo al protocolo descrito por Ruiz-Jiménez (2015). Brevemente, una alícuota de 50  $\mu$ L de exosomas aislados se incubó con 2  $\mu$ L de DIL. Se resuspendieron con pipeteo suave y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100  $\mu$ L de albumina al 1 % para retener el marcador no adherido y se incubó durante 5 minutos más. Se agregaron 200  $\mu$ L de kit de aislamiento y se incubó durante toda la noche a 4° C. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con PBS 1x sin nanovesículas. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y los exosomas se resuspendieron en medio de crecimiento sin suero.

Las células Huh-7 y C6/36 se sembraron sobre un cubreobjetos en placas de 24 pozos hasta alcanzar la subconfluencia. Posteriormente, las células se incubaron con los exosomas marcados con DIL en medio de cultivo sin suero por 3, 6 y 12 h a 37 °C. Como control, las células se incubaron con DIL y albúmina. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron lavados sucesivos con medio de cultivo para eliminar el exceso de exosomas no captados por las células (Horibe et al., 2018; Morelli et al., 2004; Svensson et al., 2013).

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 30 minutos y se trataron para analizarse por microscopía confocal y citometría de flujo para determinar el mecanismo de internalización y el porcentaje de células que lograron captar a los exosomas.

### **6.9 Neutralización de CD81 previo a la interacción de los exosomas con células Huh-7**

Se analizó el papel que tiene la tetraspanina CD81 en el proceso de entrada de los exosomas provenientes de células C6/36 infectadas con DENV2, mediante un ensayo de bloqueo con anticuerpos monoclonales anti-CD81 (B-11) (sc-166029). Los anticuerpos se diluyeron 1:300 en medio sin suero y se incubaron por 2 h a 37° C en células Huh-7. Posteriormente, se añadieron los exosomas provenientes de células C6/36 infectadas en medio sin suero y se incubaron por 24 h (Sims et al., 2018). Como control se incubaron los exosomas con el anticuerpo anti-Lamina A y exosomas sin anti-CD81. Para determinar la infección, las células se marcaron con el anticuerpo anti-NS3 una dilución 1:300 y se trataron para observarse en microscopía confocal.

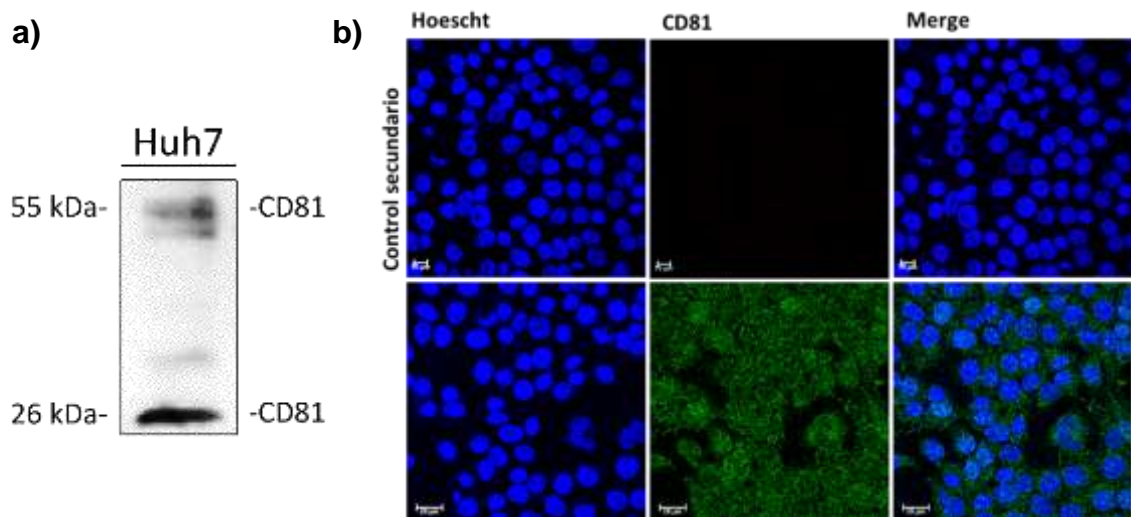
### **6.10 Ensayo de placas**

Para determinar si los exosomas acarrean consigo material viral replicativo, como el genoma o partículas virales, se realizó un ensayo de placas. Se cultivaron células BHK-21 y se incubaron dos diluciones de los exosomas en solución HANKS, 1:25 y 1:50 por 2 h a 37 °C. Posteriormente, se agregó una solución de carboximetilcelulosa al 0.8 % suplementada con 7.5 % de SFB y se incubó por 5 días a 37 °C. Después del tiempo de incubación, las células se tiñeron con azul negro de naftol por 2 h para contar las placas formadas.

## 7. Resultados

### 7.1 El anticuerpo anti-CD81 reconoce la tetraspanina en células Huh-7

La reactividad del anticuerpo anti-CD81 en células Huh-7, fue determinada mediante ensayos de western blot e inmunofluorescencia indirecta. Para ello, 30 µg del extracto de proteínas totales de células Huh-7 se sometieron a electroforesis y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue sometida a Western blot utilizando los anticuerpos anti-CD81. Como puede observarse, se obtuvo una banda de 26 kDa y otra de 55 kDa aproximadamente, las cuales corresponden a los monómeros y a los dímeros respectivamente de la tetraspanina CD81, respectivamente (figura 5a).



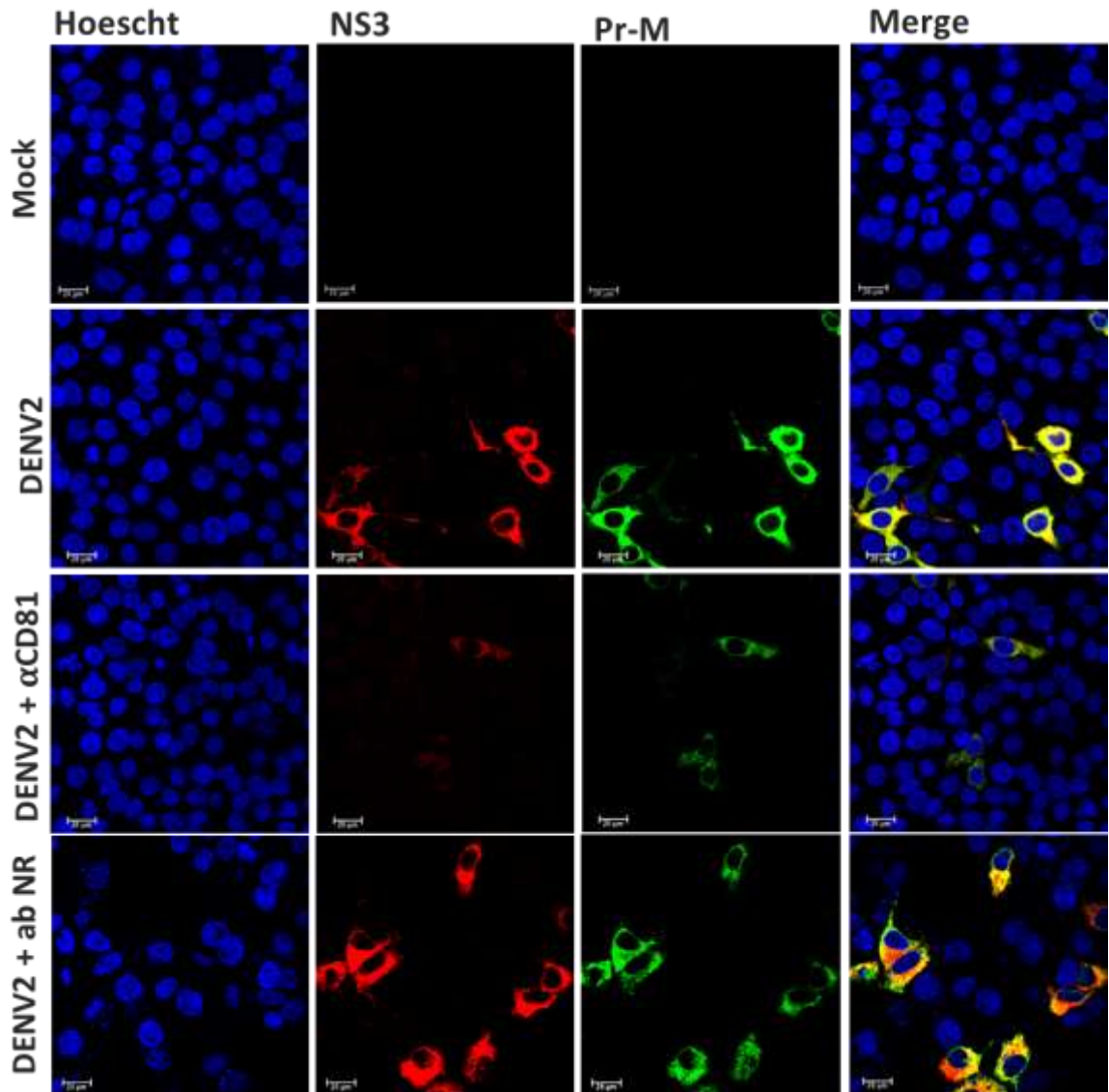
**Figura 5. Detección de la tetraspanina CD81 en células Huh-7.** a) Ensayo de Western blot. b) Inmunodetección.

La reactividad del anticuerpo también se determinó mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. En las imágenes se puede observar la presencia de la tetraspanina CD81 en color verde (figura 5b). A pesar de que CD81 es una proteína que se encuentra en membrana, también se puede observar en el citoplasma de las células.

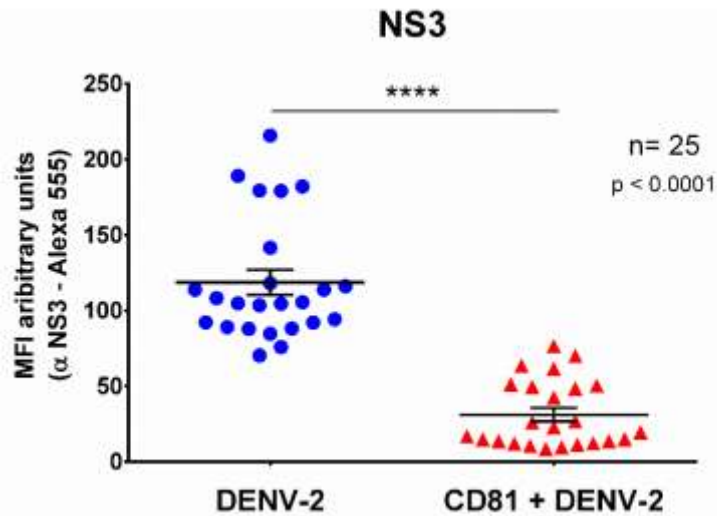
## **7.2 La neutralización de CD81 en Huh-7 disminuye la infección por DENV2**

La tetraspanina CD81 ha sido ampliamente estudiada por sus diversas funciones fisiológicas e inmunológicas, sin mencionar su importante participación en las infecciones virales. Es por ello que se planteó la posibilidad de que esta proteína tuviera un rol importante en la infección por DENV2. Para ello, se realizó un ensayo de neutralización con anticuerpos dirigidos contra CD81 en células Huh-7. De acuerdo al fabricante, este anticuerpo está dirigido al asa extracelular, la cual es un dominio importante para las interacciones con otras proteínas y la formación de los TEMs.

El anticuerpo se incubó en las células durante 2 h a 37° C, seguido de la infección con DENV2 a una MOI de 1 por 24 horas. Se fijaron las células y se procesaron para analizarse por microscopía confocal y citometría de flujo. Como control, se incubó un anticuerpo no relacionado para descartar que la disminución de la infección se deba a la presencia de inmunoglobulinas. La infección se determinó utilizando anticuerpos dirigidos a la proteína viral NS3 y Pr-M. En las inmunofluorescencias, se observó una clara disminución en la marca que corresponde a la proteína viral NS3 (color rojo) y a la proteína Pr-M (color verde) en las células que fueron tratadas con el anticuerpo anti-CD81 en comparación con las células incubadas con el anticuerpo no relacionado, utilizado para descartar que la disminución de la infección se deba a la presencia de inmunoglobulinas o en ausencia del anticuerpo (figura 6), lo que sugiere que CD81 está jugando un papel importante en la infección por DENV.

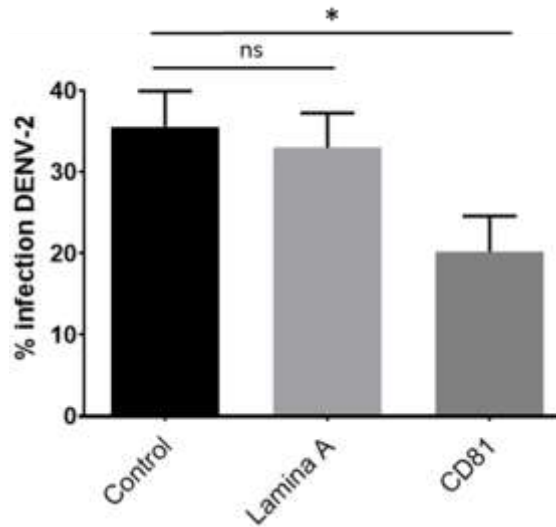


**Figura 6. La neutralización de CD81 disminuye la infección por DENV2 en células Huh-7.** Las células Huh-7 fueron no infectadas o infectadas con DENV2 en ausencia o en presencia de anticuerpos no relacionados (NR) o anti-CD81. La infección viral fue analizada mediante el marcaje de la proteína viral NS3 y prM con anticuerpos anti-NS3 (rojo) y anti-prM (verde). Los núcleos se observan en color azul. Además, se analizó la intensidad de fluorescencia media en 25 células para cada tratamiento, en donde se observó una disminución significativa de la marca de NS3 en las células tratadas con el anticuerpo anti-CD81 en comparación con el control de infección (figura 7). Estos resultados soportan la idea de que CD81 presente en las células Huh-7, participa en la infección de DENV2.



**Figura 7. Análisis de la intensidad de fluorescencia media de NS3.** Las células tratadas con el anticuerpo anti-CD81 muestran una disminución en la fluorescencia media en comparación con el control de infección

El número de células también fue analizado por citometría de flujo; las células se marcaron con el anticuerpo 2H2 que está dirigido a la proteína viral Pr-M. Los datos obtenidos se analizaron en el programa FlowJo V10 y el análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism 6.0 (figura 8). Se observó una diferencia significativa en el porcentaje de células infectadas en comparación con las tratadas con el anticuerpo anti-CD81 ( $P$  value = 0.0143). Las células tratadas con el anticuerpo no relacionado (anti-Lámina) no mostraron diferencias significativas con el control de infección.



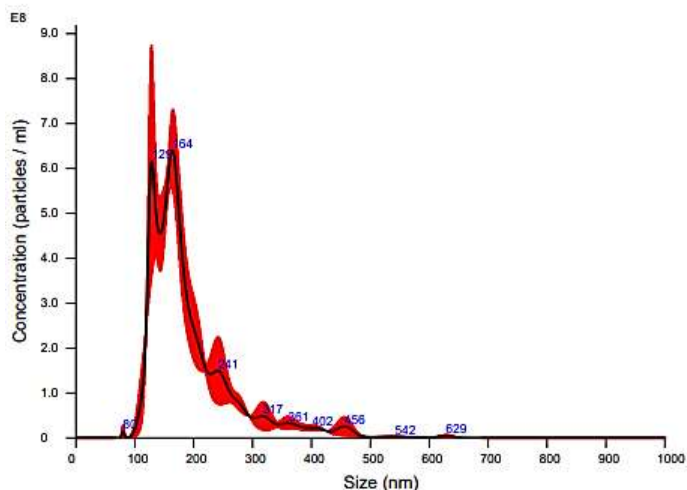
**Figura 8. La neutralización de CD81 disminuye el porcentaje de infección por DENV2 en células Huh-7**

### 7.3 Aislamiento y caracterización de SEVs

Los exosomas se aislaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares C6/36 infectados y no infectados por 48 h. El procedimiento comenzó partiendo de 250 mL de sobrenadante. Al finalizar el aislamiento, se caracterizaron las SEVs mediante rastreo de nanopartículas (NTA).

Las SEVs se resuspendieron en PBS 1X y se realizó una dilución 1:100 con un volumen final de 1 mL para caracterizarlas mediante el NTA. En el análisis de las vesículas derivadas de células no infectadas, se encontró que el tamaño de las partículas tenía una moda de 146 +/- 11.1 nm, una media de 194.2 +/- 3.6 nm y una concentración de  $5.79 \times 10^{10}$  +/-  $1.07 \times 10^9$  partículas/mL (figura 9). Los resultados del análisis de las partículas aisladas mediante ultracentrifugación, corresponde al tamaño reportado para exosomas (Gurung et al., 2021), sugiriendo que el procedimiento empleado permitió el aislamiento del tipo de vesículas que nos interesaba obtener.

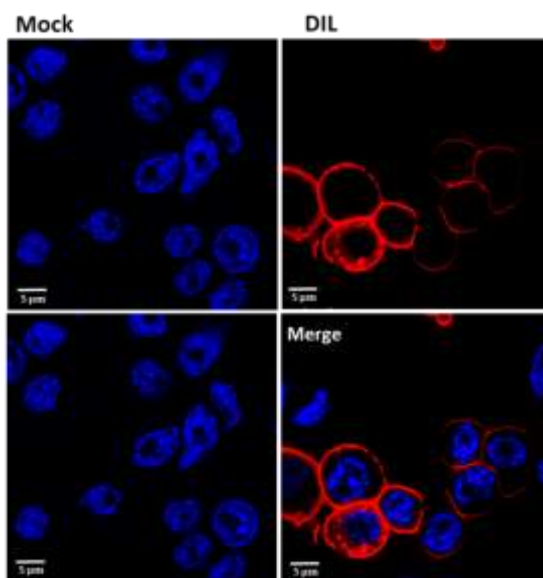




**Figura 9. Gráfica del tamaño de las partículas detectadas por el NTA contra su concentración.** Se muestra el promedio de las tres lecturas realizadas.

#### **7.4 Las SEVs de C6/36 son captadas por células de mosquito C6/36 y células de humano Huh-7**

Para poder realizar un seguimiento de la interacción de las SEVs con las células C6/36 y Huh-7, decidimos marcar las SEVs con el colorante DIL. Para poder determinar la efectividad del marcaje con DIL, el colorante fue incubado con las células C6/36 como control y fueron observadas por microscopía confocal (figura 10).



**Figura 10. El colorante DIL marca las membranas de las células C6/36**

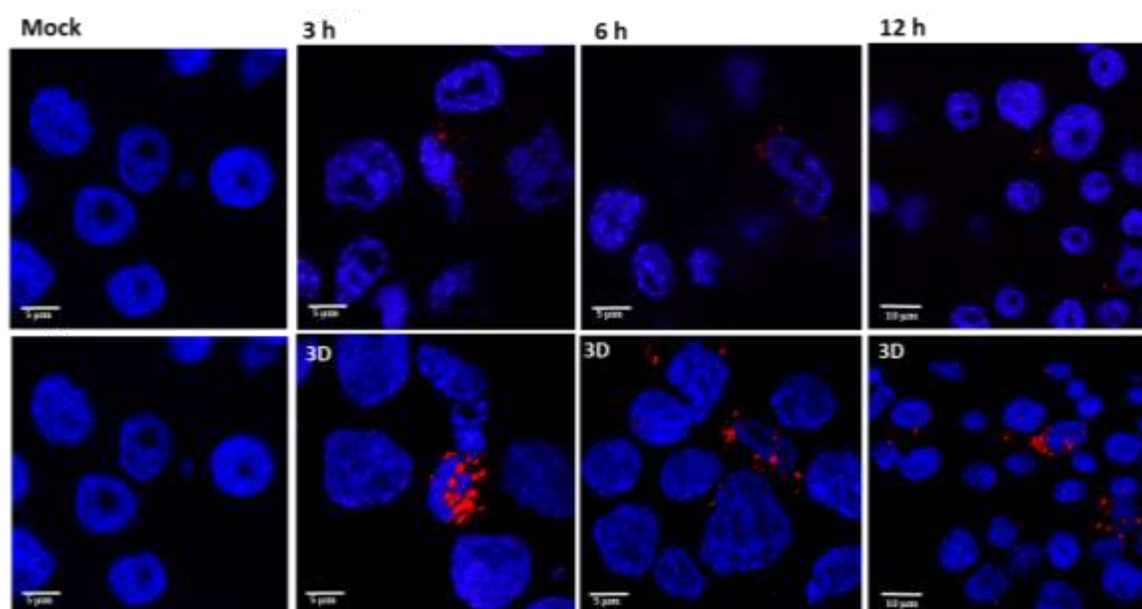
Una vez que confirmamos que el colorante DIL marcó de manera eficiente la membrana de las células C6/36, incubamos el colorante con las SEVs y resuspendidas en medio de cultivo sin suero. De acuerdo a los resultados obtenidos por el NTA y por la cuantificación de proteínas, se añadieron en cada pozo las cantidades mostradas en la siguiente tabla.

**Tabla 5. Concentración utilizada de exosomas para los ensayos de interacción**

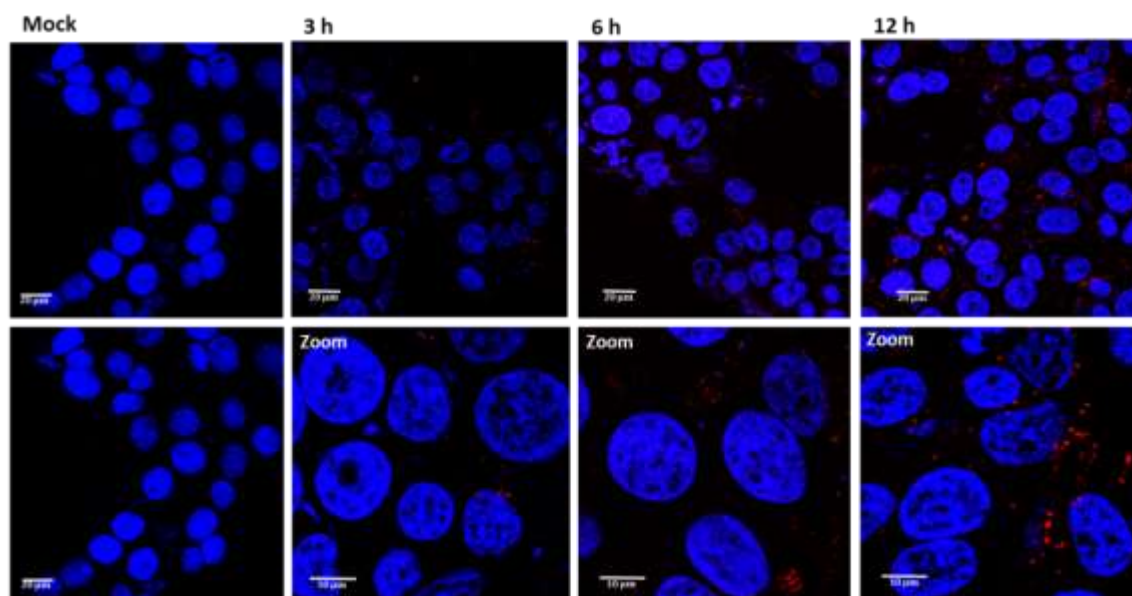
Partículas	Proteína µg	Volumen µL	Cel HUH-7/pozo
5.79X10 <sup>10</sup>	351	1000	----- -
5.79X10 <sup>10</sup>	351	2000 de MC sin suero	-----
5.79X10 <sup>9</sup>	35.1	200 de MC sin suero	3.4x10 <sup>5</sup> (placa de 24)
~17000 SEVs por célula			

Las SEVs marcadas se incubaron con las células por 3, 6 y 12 h a 37° C y posteriormente se procesaron para microscopía confocal y citometría de flujo. En la figura 11 se pueden observar las células C6/36 con los exosomas (color rojo), ubicados en la periferia del núcleo (color azul), lo cual sugiere que son capaces de ser internalizados por estas células.

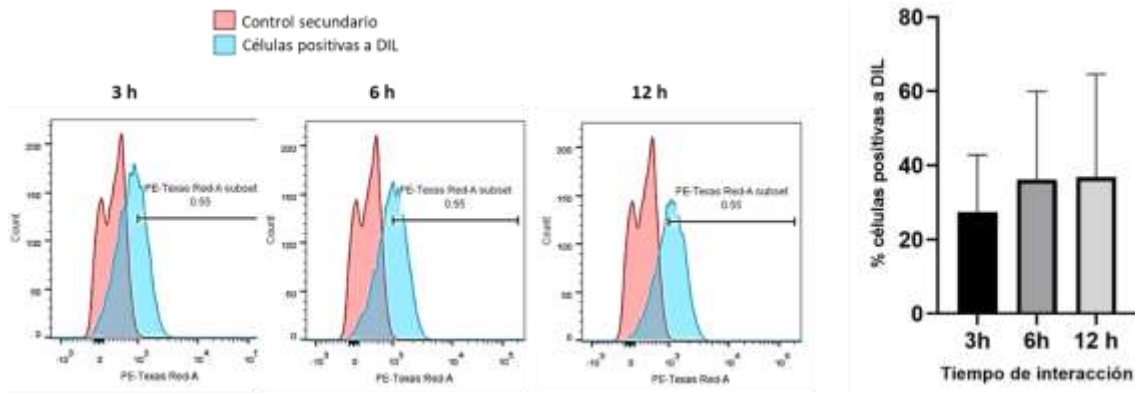
De la misma manera, se incubaron las SEVs marcadas con las células Huh-7, en donde también se observó la presencia de las SEVs dispuestas de manera irregular en la superficie celular. La cantidad de marca de las SEVs en las células parecía aumentar conforme aumentaba el tiempo de incubación (figura 12). Sin embargo, al analizar la cantidad de marca de DIL a los diferentes tiempos de incubación, no encontramos diferencias significativas entre el porcentaje de células que lograron captar a las SEVs (figura 13). Este resultado claramente nos indica que los SEVs producidos por las células C6/36 son captados por células C6/36 y por células Huh-7.



**Figura 11.** Las células C6/36 captan los exosomas provenientes de C6/36. Los exosomas (color rojo) se encuentran en la periferia del núcleo (color azul).



**Figura 12.** Las células Huh-7 son capaces de captar exosomas provenientes de células C6/36. Las células Huh-7 fueron incubadas con exosomas marcados con DIL a distintos tiempos. Las SEVs (color rojo) se observan dispuestos de manera irregular en las células.

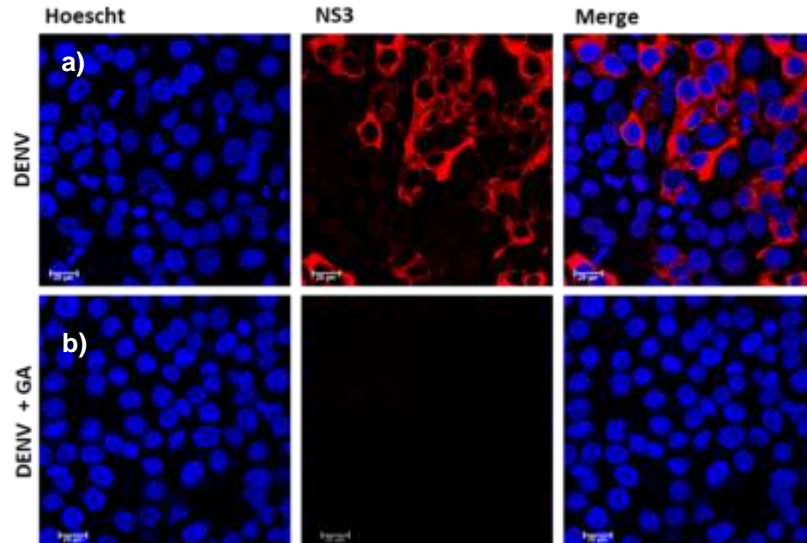


**Figura 13. La captación de exosomas no depende del tiempo de incubación.** Las células fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para DIL, sin mostrar diferencias significativas entre cada uno de los tiempos.

### 7.5 Purificación de exosomas provenientes de células infectadas e inactivación de partículas virales libres

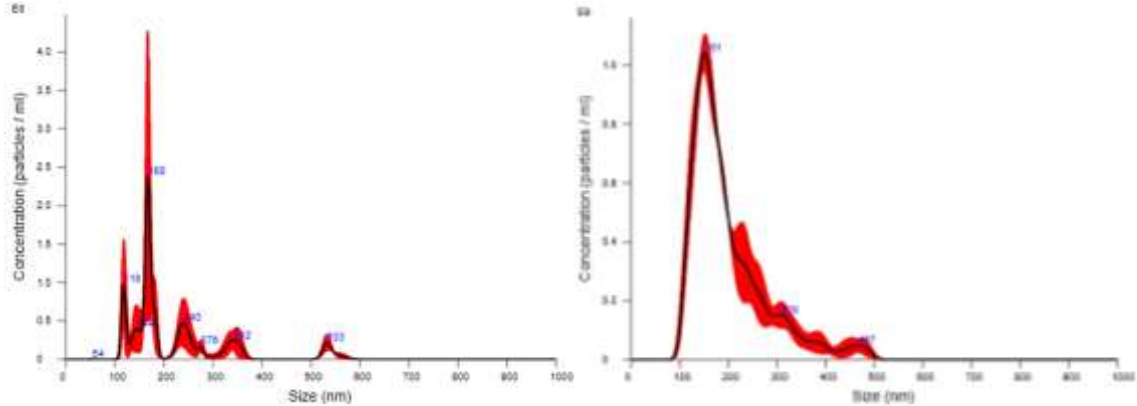
Para poder conocer la capacidad infectiva de los exosomas aislados de células C6/36, se debían eliminar de manera eficiente las partículas virales que pudieran contaminar la preparación de exosomas. Para ello, los exosomas aislados provenientes de células C6/36 infectadas con DENV2, se purificaron por inmunoprecipitación mediante el uso de perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-CD81. La elución del complejo exosoma-anticuerpo-perla se realizó con glicina ácida (pH 3.0), la cual también es utilizada en la inactivación de partículas virales libres. Para confirmar que el tratamiento con glicina-ácida es suficiente para la inactivación de partículas virales, se realizó un ensayo de inactivación del stock viral seguido de tris para neutralizar el pH. El volumen final fue diluido en medio sin suero, incubado por 24 horas en células Huh-7 y analizadas por microscopía confocal. Como control de infección se utilizó una MOI de 1 sin tratamiento alguno. En las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se puede observar la ausencia de la marca que corresponde a la proteína NS3 (color rojo) cuando se usó el stock viral tratado con glicina ácida, en comparación con una importante cantidad de células marcadas en color

rojo en las células incubadas con el virus sin tratar con glicina ácida (figura 14), lo que demuestra que la glicina ácida es capaz de inactivar a las partículas virales libres.



**Figura 14. La glicina ácida inactiva las partículas virales libres e inhibe la infección.** Las células Huh-7 se incubaron con un stock de DENV2 a una MOI de 1 sin tratar (DENV) o tratado con glicina ácida (DENV + GA). La proteína viral NS3 (rojo) marca a las células infectadas. Los núcleos se tiñeron con Hoescht.

Una vez purificados los exosomas por inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-CD81, así como el sobrenadante resultante, se caracterizaron por análisis de rastreo de nanopartículas. En la fracción precipitada se obtuvo una media en el tamaño de 222.1 +/- 11.5 nm, una moda de 143.6 +/- 13.9 nm y una concentración de  $9.48 \times 10^9$  partículas/mL. En el sobrenadante se obtuvieron valores de media de 199.6 +/- 2.2 nm, de moda 151 +/- 2 nm y una concentración de  $1.12 \times 10^{11}$  partículas/mL (figura 15).



**Figura 15. Tamaño y concentración de las SEVs inmunoprecipitadas y del sobrenadante.** Del lado izquierdo se muestran las SEVs inmunoprecipitadas cuantificadas por su tamaño. Del lado derecho se muestran las SEVs del sobrenadante.

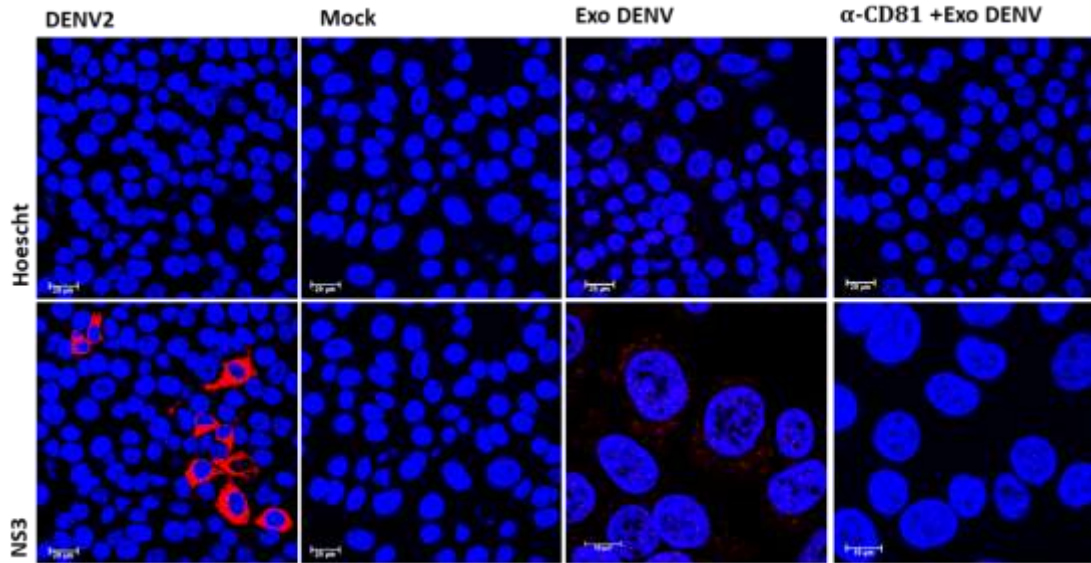
### **7.6 La neutralización de CD81 en Huh-7 inhibe la captación de SEVs de C6/36 infectadas con DENV2**

Se ha reportado la relevancia de la tetraspanina CD81 en distintas funciones celulares, una de ellas es su participación en la captación de los exosomas. Es por ello que, para determinar si CD81 participa en la captación de exosomas derivados de células C6/36 por las células Huh-7, estas fueron incubadas con anticuerpos dirigidos a CD81 por 2 horas. Después, los exosomas aislados de cultivos celulares infectados por DENV2 y purificados por inmunoprecipitación, se incubaron con las células por 24 horas a 37° C. Como control positivo se infectaron las células con DENV2 a una MOI de 1 y como también se incubaron SEVs provenientes de células no infectadas (Mock). Todos los tratamientos se analizaron mediante microscopía confocal.

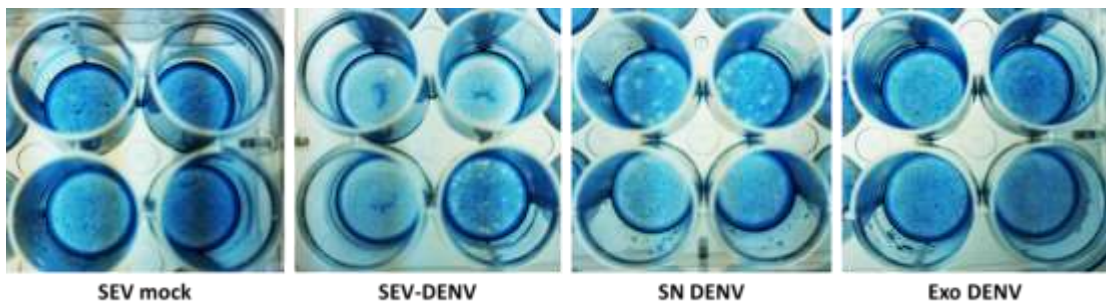
Interesantemente, la incubación de las células Huh-7 con el anticuerpo anti-CD81 redujo de manera significativa la marca correspondiente a la proteína viral NS3 (rojo), en comparación con la cantidad de marca de NS3 presente en las células incubadas sin anticuerpos anti-CD81 (figura 16). Estos resultados sugieren que CD81 participa en la captación por parte de las células Huh-7 de los exosomas provenientes de células C6/36 infectadas con DENV2.

Para determinar si los exosomas seleccionados con el anticuerpo anti-CD81 acarrean componentes virales capaces de establecer una infección, se realizó un ensayo de placas. Se realizaron dos diluciones, 1:25 y 1:50 y se incubaron con las células BHK-21. Además, se incubaron las SEVs, sin purificar y el sobrenadante de la inmunoprecipitación, es decir, aquellas vesículas no seleccionadas con el anticuerpo y posibles partículas virales. Como control, se incubaron los exosomas provenientes de células sin infectar.

En el ensayo, se observaron placas líticas en las SEVs sin purificar en la dilución 1:50 y en el sobrenadante de la inmunoprecipitación en la dilución 1:25, lo que sugiere que en estas fracciones se encuentran tanto partículas virales como vesículas con componentes virales capaces de replicarse. Sin embargo, en los exosomas seleccionados con el anticuerpo anti-CD81, no se observó la formación de las placas líticas, lo que sugiere que esta población de exosomas acarrea la proteína viral NS3, más no componentes virales infecciosos (figura 17).



**Figura 16.** La incubación del anticuerpo dirigido a CD81 disminuye la captación de exosomas provenientes de C6/36 infectadas con DENV2.



**Figura 17.** Los exosomas purificados con el anticuerpo anti-CD81 no forman placas líticas en células BHK-21.



## 8. Discusión

La entrada viral en la célula, es uno de los procesos más importantes en el ciclo replicativo, el cual se compone de etapas como unión, internalización, escape endosomal y desprendimiento de la cápside (Cordero-Rivera et al., 2021). Se han identificado diversas moléculas involucradas en la entrada del DENV, como Heparán Sulfato, DC-SIGN, CD14, HSP90, HSP70, receptor de unión a manosa, GRP-78, TIM-1, AXL, entre otras descritas en células de humano (Cordero-Rivera et al., 2021; Cruz-Oliveira et al., 2015). La identificación de estos receptores es de suma importancia, debido a que pueden funcionar como moléculas blanco para un tratamiento específico para la enfermedad causada por el DENV.

Por otro lado, en los últimos años se han estudiado a las vesículas extracelulares como una vía alternativa de propagación de distintos virus como el HTLV-1, HIV-1, HCV, VPH, ZIKV, debido a la presencia de componentes virales infecciosos dentro de estas vesículas, los cuales viajan protegidos por la doble membrana, sin que sean detectados por el sistema inmune. Particularmente en DENV, se ha reportado la presencia de componentes virales dentro de los exosomas provenientes de células de mosquito C6/36, como el genoma viral completo y partículas similares a virus, los cuales poseen una capacidad infecciosa en distintas líneas celulares de mamífero (Reyes-Ruiz et al., 2019; Vora et al., 2018).

CD81 es una tetraspanina que se encuentra en la membrana celular la cual ha tomado relevancia debido a la interacción que tiene con diversas moléculas, como integrinas, moléculas de adhesión y otras tetraspaninas. Esta amplia capacidad de interacción hace que las tetraspaninas puedan participar en la formación de TEMs, en la biogénesis, la selección de moléculas cargo y la captación de exosomas, así como en la entrada de distintos virus (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Se sabe que las tetraspaninas albergan en los TEMs múltiples componentes de la membrana celular, como receptores, moléculas

de señalización, lípidos, mejorando la interacción entre las proteínas virales y celulares (Florin & Lang, 2018; Hantak et al., 2019).

Estos estudios han sugerido que se debe considerar a las tetraspaninas para el desarrollo de nuevas terapias para combatir las infecciones por flavivirus (Ahmed et al., 2021).

Es por ello que, en este trabajo se analizó el papel que tiene CD81 en la entrada de partículas virales de DENV2, así como en la entrada de los exosomas provenientes de células C6/36 infectadas con DENV2.

Como modelo de estudio, se utilizaron células Huh-7, las cuales fueron incubadas con anticuerpos dirigidos a CD81, que de acuerdo al fabricante, reconoce una secuencia de aminoácidos que corresponde al dominio del asa extracelular larga (LEL). Este dominio ha sido estudiado debido a su importancia en la interacción con otras proteínas y la formación de las redes de tetraspanina. El LEL está conformado por cinco subdominios  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  (región constante)  $\gamma$  y  $\delta$  (región variable). El dominio  $\delta$  ha sido identificado como el responsable de la dimerización de CD81, así como de la formación de las TEMs de CD81, lo cual conlleva a formación de las plataformas utilizadas en la entrada viral (Homsí et al., 2014).

Posterior a la incubación con el anticuerpo, se llevó a cabo la infección por 24 h. Las células fueron analizadas por microscopía confocal y citometría de flujo, donde se observó una disminución de la infección por DENV. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que se han utilizado anticuerpos dirigidos a CD81 y se disminuye la infección viral (Earnest et al., 2015; Florin & Lang, 2018). Algunos de los mecanismos que se han sugerido para esta disminución es la desestabilización de las TEMs, lo que interfiere en la interacción de las proteínas virales con sus receptores específicos (Earnest et al., 2015). Sin embargo, también podría estar ocurriendo algo similar a lo reportado con VHC, en donde CD81 interactúa de manera directa con la glicoproteína E del virus, funcionando como un correceptor que media la internalización del virus (Cormier et al., 2004; Fénéant et al., 2014; Florin & Lang, 2018). Se necesitan

más estudios para dilucidar el mecanismo por el cual DENV se asocia a CD81 para entrar a la célula hospedera e identificar cual es la etapa de la entrada (unión, internalización, escape endosomal) que se interfiere con el uso de anticuerpos a tempranas horas de la infección.

En estudios anteriores, se ha reportado que los exosomas provenientes de células C6/36 infectados con DENV o con ZIKV son capaces de establecer una infección en células de mamífero, como células Vero, células dendríticas derivadas de monocitos de ratón (Mo-DCs), queratinocitos de piel humana (HaCat), células endoteliales de sangre humana (HUVEC) y células endoteliales microvasculares (HMEC-1) (Martínez-Rojas et al., 2020; Vora et al., 2018). Es por ello que se planteó la hipótesis de que los exosomas derivados de células C6/36 pudieran ser captados por células Huh-7.

Para realizar los ensayos de captación de exosomas, se comenzó con el aislamiento de las vesículas de los sobrenadantes de cultivos celulares C6/36 de 48 h. Esto se realizó mediante la metodología de la ultracentrifugación, la cual es ampliamente recomendada para aislar vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) (Coughlan et al., 2020) y se ha utilizado para aislar exosomas de esta línea celular (Martínez-Rojas et al., 2020; Reyes-Ruiz et al., 2019). Las SEVs aisladas contienen una población heterogénea de vesículas, que de acuerdo a los resultados del NTA, presenta una media de 194 nm y una moda de 146 nm. Estos tamaños concuerdan con la clasificación propuesta para los exosomas (Gurung et al., 2021) y con los datos anteriormente reportados para exosomas aislados de C6/36, que van de 30 a 250 nm (Vora et al., 2018).

Una vez caracterizadas las SEVs, se realizaron ensayos de captación de estas vesículas provenientes de células C6/36 en células C6/36 y Huh-7. Las SEVs fueron marcadas con DIL e incubadas con las células a distintos tiempos. Posteriormente fueron analizados por microscopía confocal y citometría de flujo. En diversos ensayos de captación de exosomas, se describe como un proceso activo que depende del número de exosomas por célula, del tiempo

de incubación, así como del tipo celular que se esté estudiando, es decir, si pertenece a la misma línea celular del que se originaron los exosomas o de una distinta (Jurgielewicz et al., 2020). En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que tanto células C6/36 como células Huh-7 fueron capaces de captar los exosomas de C6/26, no obstante, no se pudo determinar el mecanismo de captación y tampoco se observó una dependencia del tiempo. Se sabe que el principal mecanismo realizado por la mayoría de las células es la endocitosis, aunque también se ha reportado la fusión de las membranas de la célula y los exosomas para la entrega de moléculas cargo (Gurung et al., 2021). Esto podría ser analizado empleando inhibidores de la endocitosis para determinar el mecanismo de entrada que sucede con los exosomas y las líneas celulares estudiadas en este trabajo.

Una vez determinada la captación de SEVs por células Huh-7, se prosiguió a analizar si los exosomas eran capaces de establecer la infección por DENV2.

Para asegurarnos de que los exosomas no están contaminados con partículas virales libres y que la infección establecida proviene de componentes virales que viajan dentro de los exosomas, se realizó un paso adicional de purificación utilizando perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-CD81. Una vez formado el complejo exosoma-anticuerpo-perla, este fue disociado con un buffer de elución con glicina ácida con un pH de 3.0. Además de eluir, la glicina ácida es utilizada para inactivar las partículas virales del DENV (Castellanos et al., 2016), lo que nos asegura que los exosomas están libres de partículas infecciosas. Esto se comprobó tratando al stock viral con glicina ácida, el cual posteriormente fue incubado con células Huh-7 por 24 h y analizado por microscopía confocal. En las imágenes obtenidas no se observó la presencia de la proteína viral NS3, lo que demuestra que el tratamiento con glicina ácida es efectivo para inactivar las partículas virales del DENV.

Una vez purificados, los exosomas fueron incubados con las células Huh-7 por 24 h y estas se procesaron para microscopía confocal marcando la proteína viral NS3. Se observó una marca que corresponde a NS3, sin embargo,

comparado con el control de infección, la marca se ve muy disminuida. Aunado a esto, en el ensayo de placas no se observó la formación de placas líticas con la incubación de los exosomas purificados con el anticuerpo anti-CD81. Esto sugiere que los exosomas seleccionados con el anticuerpo anti-CD81 acarrean a NS3, más no material infeccioso, como el genoma viral o partículas similares a virus, como se ha reportado anteriormente (Reyes-Ruiz et al., 2019; Vora et al., 2018).

Esto plantea la hipótesis de que las distintas poblaciones de exosomas acarrean distintas moléculas cargo, por ejemplo, se ha reportado que la tetraspanina Tsp29Fb de mosquito, ortóloga a CD63 humano, se asocia con la proteína viral E de DENV2 y que al silenciarla o bloquearla, se reduce de manera significativa su exportación en los exosomas (Vora et al., 2018). En otro estudio, los exosomas provenientes de células C6/36 infectadas con DENV, se seleccionaron con el anticuerpo anti-CD9, en los cuales se observaron partículas similares a virus y fueron capaces de establecer infección en células C6/36 (Reyes et al., 2018). Este resultado debe ser confirmado por otras metodologías, como western blot, para determinar los componentes virales que viajan en los exosomas positivos a CD81. Se necesitan más estudios para caracterizar las distintas poblaciones de exosomas provenientes de células de mosquito infectadas con DENV y determinar las moléculas cargo asociadas a las distintas tetraspaninas.

Finalmente, se estudió la relevancia de CD81 en la captación de exosomas provenientes de células C6/36 infectadas. Se trataron las células Huh-7 con el anticuerpo dirigido a CD81, y se incubaron los exosomas purificados por 24 h. Las células se procesaron marcando la proteína NS3 y se analizaron por microscopía confocal. En las imágenes obtenidas, no se logró observar la presencia de NS3, sugiriendo que al bloquear esta tetraspanina se inhibe la entrada de los exosomas con componentes virales. En estudios anteriores se ha reportado la relevancia que tiene CD81 en la captación de los exosomas,

en los cuales se observa una disminución de exosomas internalizados en células incubadas con anticuerpos dirigidos a CD81 (Morelli et al., 2004; Sims et al., 2018).

## **9. Conclusiones**

En este trabajo se determinó la importancia que tiene la tetraspanina CD81 en la infección por DENV2 en células Huh-7, sin embargo, se requieren más estudios para identificar el mecanismo por el cual interactúa CD81 con el virus. También, se comprobó que los exosomas provenientes de células C6/36 son capaces de ser internalizados por células de mosquito C6/36 y células de mamífero Huh-7 y que estos llevan componentes virales como la proteína viral NS3, lo cual refuerza la idea de que los exosomas son explotados como una vía de propagación por el DENV. Finalmente, se observó la relevancia que tiene CD81 en la captación de exosomas de células C6/36 en células Huh-7.

## 10. Perspectivas

- Determinar el mecanismo por el cual DENV se asocia a CD81 para entrar a la célula hospedera
- Estudiar la interacción de CD81 con DENV a tempranas horas de la infección
- Determinar el mecanismo de entrada de los exosomas provenientes de células C6/36 en células C6/36 y Huh-7
- Caracterizar los componentes virales asociados a las distintas tetraspaninas en los exosomas de C6/36



## Referencias

- Aheget, H., Tristán-Manzano, M., Mazini, L., Cortijo-Gutierrez, M., Galindo-Moreno, P., Herrera, C., Martin, F., Marchal, J. A., & Benabdellah, K. (2020). Exosome: A New Player in Translational Nanomedicine. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 2380. <https://doi.org/10.3390/jcm9082380>
- 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>
- Anderson, M. R., Pleet, M. L., Enose-Akahata, Y., Erickson, J., Monaco, M. C., Akpamagbo, Y., Velluci, A., Tanaka, Y., Azodi, S., Lepene, B., Jones, J., Kashanchi, F., & Jacobson, S. (2018). Viral antigens detectable in CSF exosomes from patients with retrovirus associated neurologic disease: Functional role of exosomes. *Clinical and Translational Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0204-7>
- Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Frontiers in Immunology*, 5, 442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
- Arredondo-García, J. L., Aguilar-López Escalera, C. G., Aguilar Lugo-Gerez, J. J., Osnaya-Romero, N., Pérez-Guillé, G., & Medina-Cortina, H. (2020). Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(2), 78-83. <https://doi.org/10.35366/94418>
- Benayas, B., Sastre, I., López-Martín, S., Oo, A., Kim, B., Bullido, M. J., Aldudo, J., & Yáñez-Mó, M. (2020). Tetraspanin CD81 regulates HSV-1 infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(4), 489-498. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00684-0>
- Castellanos, J. E., Neissa, J. I., & Camacho, S. J. (2016). La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5Y. *Biomédica*, 36, 156. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2984>

Choy, M. M., Sessions, O. M., Gubler, D. J., & Ooi, E. E. (2015). Production of Infectious Dengue Virus in *Aedes aegypti* Is Dependent on the Ubiquitin Proteasome Pathway. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(11), e0004227. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004227>

Cordero-Rivera, C. D., De Jesús-González, L. A., Osuna-Ramos, J. F., Palacios-Rápalo, S. N., Farfan-Morales, C. N., Reyes-Ruiz, J. M., & Del Ángel, R. M. (2021). The importance of viral and cellular factors on flavivirus entry. *Current Opinion in Virology*, *49*, 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.05.001>

Cormier, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P., & Dragic, T. (2004). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(19), 7270-7274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402253101>

Coughlan, C., Bruce, K. D., Burgy, O., Boyd, T. D., Michel, C. R., Garcia-Perez, J. E., Adame, V., Anton, P., Bettcher, B. M., Chial, H. J., Königshoff, M., Hsieh, E. W. Y., Graner, M., & Potter, H. (2020). Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation and Techniques for Downstream Analyses. *Current Protocols in Cell Biology*, *88*(1). <https://doi.org/10.1002/cpcb.110>

Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 155-170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>

Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, *8*(7), E727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>

Earnest, J. T., Hantak, M. P., Park, J.-E., & Gallagher, T. (2015). Coronavirus and Influenza Virus Proteolytic Priming Takes Place in Tetraspanin-Enriched

- Membrane Microdomains. *Journal of Virology*, 89(11), 6093-6104.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00543-15>
- Fénéant, L., Levy, S., & Cocquerel, L. (2014). CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Viruses*, 6(2), 535-572. <https://doi.org/10.3390/v6020535>
- Finol, E., & Ooi, E. E. (2019). Evolution of Subgenomic RNA Shapes Dengue Virus Adaptation and Epidemiological Fitness. *IScience*, 16, 94-105.  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.019>
- Florin, L., & Lang, T. (2018). Tetraspanin Assemblies in Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 1140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01140>
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
- Hantak, M. P., Qing, E., Earnest, J. T., & Gallagher, T. (2019). Tetraspanins: Architects of Viral Entry and Exit Platforms. *Journal of Virology*, 93(6).  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01429-17>
- Hassanpour, M., Rezaie, J., Nouri, M., & Panahi, Y. (2020). The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 85, 104422.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104422>
- Homsy, Y., Schloetel, J.-G., Scheffer, K. D., Schmidt, T. H., Destainville, N., Florin, L., & Lang, T. (2014). The Extracellular  $\delta$ -Domain is Essential for the Formation of CD81 Tetraspanin Webs. *Biophysical Journal*, 107(1), 100-113.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.028>
- Horibe, S., Tanahashi, T., Kawauchi, S., Murakami, Y., & Rikitake, Y. (2018). Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer*, 18(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3958-1>

ICTV. (s. f.). *Genus: Flavivirus—Flaviviridae—Positive-sense RNA Viruses—ICTV*. Recuperado 23 de julio de 2021, de [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus)

Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K., & Antalíková, J. (2020). Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7568. <https://doi.org/10.3390/ijms21207568>

Jurgielewicz, B. J., Yao, Y., & Stice, S. L. (2020). Kinetics and Specificity of HEK293T Extracellular Vesicle Uptake using Imaging Flow Cytometry. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03399-6>

Khan, G., Ahmed, W., & Philip, P. S. (2017). Exosomes and Their Role in Viral Infections. En J. Wang (Ed.), *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69397>

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>

Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of Dengue Virus. *Cell*, 108(5), 717-725. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)

Kummer, D., Steinbacher, T., Schwietzer, M. F., Thölmann, S., & Ebnet, K. (2020). Tetraspanins: Integrating cell surface receptors to functional microdomains in homeostasis and disease. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(4), 397-405. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00673-3>

- Kwok, Z. H., Wang, C., & Jin, Y. (2021). Extracellular Vesicle Transportation and Uptake by Recipient Cells: A Critical Process to Regulate Human Diseases. *Processes*, 9(2), 273. <https://doi.org/10.3390/pr9020273>
- Lasswitz, L., Zapatero-Belinchón, F. J., Moeller, R., Hülskötter, K., Laurent, T., Carlson, L.-A., Goffinet, C., Simmons, G., Baumgärtner, W., & Gerold, G. (2022). The Tetraspanin CD81 Is a Host Factor for Chikungunya Virus Replication. *MBio*, 13(3), e00731-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00731-22>
- Levy, S., & Shoham, T. (2005). Protein-Protein Interactions in the Tetraspanin Web. *Physiology*, 20(4), 218-224. <https://doi.org/10.1152/physiol.00015.2005>
- Longatti, A., Boyd, B., & Chisari, F. V. (2015). Virion-Independent Transfer of Replication-Competent Hepatitis C Virus RNA between Permissive Cells. *Journal of Virology*, 89(5), 2956-2961. <https://doi.org/10.1128/JVI.02721-14>
- 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>
- 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>
- McKelvey, K. J., Powell, K. L., Ashton, A. W., Morris, J. M., & McCracken, S. A. (2015). Exosomes: Mechanisms of Uptake. *Journal of Circulating Biomarkers*, 4, 7. <https://doi.org/10.5772/61186>
- Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*, 28(8), R435-R444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>

Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, *104*(10), 3257-3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>

Mori, Y., Koike, M., Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H., Uchiyama, Y., & Yamanishi, K. (2008). Human Herpesvirus-6 Induces MVB Formation, and Virus Egress Occurs by an Exosomal Release Pathway. *Traffic*, *9*(10), 1728-1742. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00796.x>

Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1), 24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>

Nanaware, N., Banerjee, A., Mullick Bagchi, S., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2021). Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. *Viruses*, *13*(10), 1967. <https://doi.org/10.3390/v13101967>

New, C., Lee, Z.-Y., Tan, K. S., Wong, A. H.-P., Wang, D. Y., & Tran, T. (2021). Tetraspanins: Host Factors in Viral Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 11609. <https://doi.org/10.3390/ijms222111609>

Ng, W. C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S. S., Garcia-Blanco, M. A., & Ooi, E. E. (2017). The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses*, *9*(6), E137. <https://doi.org/10.3390/v9060137>

OMS, Organización Mundial de la Salud. (s. f.). *Dengue y dengue grave*. Recuperado 23 de julio de 2021, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(4), 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>

Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Rooter, P. E., Willemsen, R., Demmers, J. A. A., Stalin Raj, V., Jenster, G., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W., Haagmans, B. L., Baumert, T. F., & van der Laan, L. J. W. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(32), 13109-13113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110>

Rana, S., & Zöller, M. (2011). Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: A hypothesis. *Biochemical Society Transactions*, *39*(2), 559-562. <https://doi.org/10.1042/BST0390559>

Reyes, R., Cardeñes, B., Machado-Pineda, Y., & Cabañas, C. (2018). Tetraspanin CD9: A Key Regulator of Cell Adhesion in the Immune System. *Frontiers in Immunology*, *9*, 863. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00863>

Reyes-Ruiz, J. M. (2019). *Estudio de la interacción virus-hospedero: Implicaciones de la adaptación, infección y diseminación del virus Dengue en células de su mosquito vector*. Cinvestav.

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>

Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: Epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian Journal of Microbiology*, *67*(10), 687-702. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>

Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudrière-Gesbert, C., & Conjeaud, H. (2001). Structure of the Tetraspanin Main Extracellular Domain. *Journal of*

*Biological Chemistry*, 276(43), 40055-40064.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M105557200>

Sims, B., Farrow, A. L., Williams, S. D., Bansal, A., Krendelchtchikov, A., & Matthews, Q. L. (2018). Tetraspanin blockage reduces exosome-mediated HIV-1 entry. *Archives of Virology*, 163(6), 1683-1689.

<https://doi.org/10.1007/s00705-018-3737-6>

SINAVE/DGE/SSA, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (s. f.). *Panorama Epidemiológico de Dengue 2022*. Recuperado 23 de julio de 2021, de <http://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2022>

Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., & Hemler, M. E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(2), 106-112.

[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00014-2)

Sultana, H., & Neelakanta, G. (2020). Arthropod exosomes as bubbles with message(s) to transmit vector-borne diseases. *Current Opinion in Insect Science*, 40, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.05.017>

Svensson, K. J., Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., Mörgelin, M., & Belting, M. (2013). Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17713-17724.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445403>

Termini, C. M., & Gillette, J. M. (2017). Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00034>

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-Galicia, I., & Cortés-Poza, D. (2014). Dengue en México: Análisis de dos décadas. *Gaceta Médica de México.*, 6.

Vanlerberghe, V., & Verdonck, K. (2014). La inequidad en salud: El caso del dengue. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(4). <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2013.304.252>

Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: Estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)

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*, 115(28), E6604-E6613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720125115>

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 365-375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>

Wiley, R. D., & Gummuluru, S. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 738-743. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507995103>

Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., & Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: A functional unit in

cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology*, 19(9), 434-446.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.004>

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>