



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE EVASIÓN  
DE LA RESPUESTA DE INTERFERONES DE TIPO I  
ENTRE AISLADOS CLÍNICOS DE *FLAVIVIRUS*  
CIRCULANTES EN MÉXICO**



**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**Laura Cristina Gómez Legorreta**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JOSÉ BUSTOS ARRIAGA**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019



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.

### *AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES*

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Arbovirus de la Unidad de Investigación en Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, con los siguientes apoyos financieros: UNAM, PAPIIT IA209017: UANM PAPIIT IA 204119 y CONACYT PROBLEMAS NACIONALES 2029.

### *AGRADECIMIENTOS*

A mi director de tesis, Dr. José Bustos-Arriaga por su tiempo y paciencia para enseñarme nuevas técnicas y procedimientos, pero sobre todo por inculcarme curiosidad científica, agradezco infinitamente cada momento dedicado a este proyecto, a mi formación académica y por inspirarme a ser siempre mejor.

A mis sinodales Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, Dr. Felipe Vaca Paniagua, Dr. José Luis, Dra. Leticia Cedillo Barrón, por sus observaciones, apoyo y dirección.

A quienes forman parte del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Arbovirus de la UBIMED, especialmente a la Q.F.B Tannya Karen Castro Jiménez, C.D Gustavo Guerrero López y Laura Alejandra López Campa.

### *AGRADECIMIENTOS PERSONALES*

A mis padres por siempre apoyarme, cuidarme, guiarme y procurar mi bienestar. Gracias mamá linda por demostrarme que cualquier obstáculo se puede superar, gracias papá por motivarme a conocer siempre la respuesta correcta, a mi hermano por estar siempre que lo he necesitado. Los amo.

A mi tío Martín Gómez por su apoyo, por sus consejos y por siempre tener tiempo para platicar conmigo, a mis y tías Julieta Gómez por su apoyo amor y comprensión y Rosita Legorreta por su profundo cariño y por siempre estar presente en momentos importantes de nuestra vida.

A mis amigos, por ser con quienes compartí experiencias inolvidables, con quienes vi paisajes maravillosos, con quienes pase noches enteras haciendo proyectos, elaborando reportes, estudiando, cantando, bailando y que sin importar si estamos juntos o no siempre podrán contar con mi apoyo amistad y cariño: Daniel Corona, Daniel Flores, Yael Reyes y Alejandra Campa los quiero como no imaginan. Ale gracias por acompañarme en todo momento, aguantar los berrinches, por cuidarme y limpiar mis anteojos, por estar siempre al pendiente y alentarme a seguir.

# CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS Y ACRONIMOS</b> .....	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEORICO</b> .....	<b>2</b>
2.1. GENERALIDADES DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE .....	2
2.1.1 Estructura genómica y protéica de los Flavivirus .....	2
2.1.2. Ciclo replicativo de los Flavivirus .....	6
2.2 PRINCIPALES VECTORES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA .....	8
2.2.1. Epidemiología en México .....	9
2.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA E HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE Y ZIKA .....	9
2.3.1. Presentaciones clínicas de la infección con DENV .....	9
2.3.2. Presentaciones clínicas de la infección con ZIKV .....	11
2.4. RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA FLAVIVIRUS .....	12
2.4.1 Detección de PAMPs virales por los PRRs.....	13
2.4.2. Interferones de tipo I .....	15
2.4.3. ISGs con actividad contra los virus DENV y ZIKV .....	17
2.5. MECANISMOS DE LA EVASIÓN A LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR FLAVIVIRUS .....	17
2.5.1 Antecedentes directos .....	19
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1. Líneas celulares .....	21

5.2. Amplificación y purificación de preparaciones virales .....	21
5.3. Cuantificación unidades formadoras de placas (UFP) por inmucitoquímica .....	22
5.4. Evaluación del fenotipo de evasión de IFNs-I .....	22
5.5. Análisis estadísticos .....	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>35</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>36</b>

## **ABREVIATURAS Y ACRONIMOS**

**+ssRNA** *Positive-Sense, Single-Stranded RNA* - RNA monocatenario de polaridad positiva

**ADAR** *adenosine deaminase, RNA specific* - RNA específica, adenosina desaminasa

**ADE** *antibody dependent enhancement* - facilitamiento mediada por anticuerpos

**C** proteína de la cápside

**CHIKV** virus Chikungunya

**CPE** *cytopathic effect* - efecto citopático

**DENV** virus dengue

**DF** dengue fever - fiebre por dengue

**DSS** dengue shock syndrome - síndrome de choque por dengue

**DHF** dengue haemorrhagic fever - fiebre hemorrágica del dengue

**E** glicoproteína de envoltura

**ER** retículo endoplasmático

**GBS** síndrome Guillain-Barre

**kDa** kilodaltones

**LGP2** laboratory of genetics and physiology 2 and a homolog of mouse D111gp2 - laboratorio de genética y fisiología 2 y un homólogo de ratón D111gp2

**M** proteína de membrana

**Mx** GTPasa de la familia de Mx, ISGs

**MBFV** *Flavivirus* transmitidos por mosquitos

**MDA5** melanoma differentiation associated factor 5 - antígeno de diferenciación de melanoma asociado al factor 5

**MOI** multiplicity of infection – multiplicidad de infección



**NC** nucleocápside

**NCFV** *Flavivirus* no clasificados

**NF- $\kappa$ B** nuclear factor kappa B - factor nuclear  $\kappa$ B

**NKFV** *Flavivirus* de vector desconocido

**NSPs** proteínas no estructurales

**NTPase** nucleósido trifosfatasa

**HSPG** proteoglicano de heparán sulfato

**IFITM** IFN-induced transmembrane - proteínas transmembrana inducibles por IFN

**IFNs-I** type IFN - interferones de tipo I

**IRF** IFN regulatory factor - factor regulador de interferón

**ISFV** *Flavivirus* específicos de insectos

**ISGF3** IFN-stimulated gene factor 3 - factor genético estimulado por IFN 3

**ISGs** Interferon-stimulated gene - genes estimulados por IFN

**ISRE** interferon-stimulated response element - elementos de respuesta estimulados por IFN

**JAK1** Janus kinase - cinasa de Janus

**OAS** oligoadenylate synthetase - oligoadenilato sintetasa

**ORF** open reading frames - marco de lectura abierto

**PAMPs** pathogen-associated molecular patterns - patrones moleculares asociados a patógenos

**PKR** RNA-dependent protein kinase - proteína cinasa dependiente de dsRNA.

**prM** glicoproteína precursora de membrana

**PRRs** pattern recognition receptors - receptores de reconocimiento de PAMPs

**PS** phosphatidylserine - fosfatidilserina

**RC** replicative complex - complejo replicativo

**RdRp** RNA-dependent RNA polymerase - RNA polimerasa dependiente de RNARIG-I  
retinoic acid-inducible gene I - gen inducible por el ácido retinoico I

**RLRs** RIG-I-like receptors – receptores tipo RIG-I

**RNA** ribonucleic acid - ácido ribonucleico

**RNaseL** Ribonuclease L - ribonucleasa L

**sfRNA** subgenomic *Flavivirus* RNA - RNA flaviviral subgenómico

**STAT** Signal transducer and activator of transcription - transductor de señal y activador de la transcripción

**TBFV** tick-borne *Flaviviruses* - *Flavivirus* transmitidos por garrapatas

**TIM** T-cell immunoglobulin and mucin domain - dominio de inmunoglobulina y dominio de mucina

**TLRs** Toll-like receptors - receptores tipo Toll

**TYK2** Tyrosine Kinase 2 - tirosina cinasa 2

**TMDs** transmembrane domains - dominios transmembranales

**TRIF** TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  - adaptador que contiene el dominio TIR que induce IFN $\beta$

**TRIM** tripartite motif - motivo tripartito

**UTR** untranslated región - regiones no traducidas

**ZIKV** virus Zika

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.</b> Estructura genómica y protéica de <i>Flavivirus</i> . Consiste .....	3
<b>Figura II.</b> Ciclo replicativo de <i>Flavivirus</i> .....	6
<b>Figura III.</b> Distribución geográfica de los vectores para DENV y ZIKV .....	8
<b>Figura IV.</b> Ciclo urbano del <i>Flavivirus</i> en humanos y mosquitos .....	10
<b>Figura V.</b> Respuesta inmune innata celular intrínseca a la infección por <i>Flavivirus</i> ...	23
<b>Figura VI.</b> Morfología de las placas generadas por virus referencia y aislados clínicos .....	14
<b>Figura VII.</b> Análisis por microscopía confocal del fenotipo evasor de IFN-I de DEN-1 y ZIKV.....	25
<b>Figura VIII.</b> Análisis semicuantitativo del fenotipo evasor de IFN-I entre virus referencia y aislados clínicos.....	26
<b>Figura IX.</b> Curva de sensibilidad a IFN- $\alpha$ .....	28
<b>Figura X.</b> Actividad antiviral mediada por IFN- $\alpha$ .....	29

## 1. RESUMEN

Los virus dengue (DENV) y Zika (ZIKV) son agentes etiológicos de enfermedades con patrones epidemiológicos alarmantes tanto para la salud humana como para la economía mundial. La transmisión de estos *Flavivirus* está influenciada por la lluvia, la temperatura y principalmente la distribución de sus vectores, los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Los *Flavivirus*, cuentan con gran capacidad de adaptación a presiones evolutivas como la capacidad variable de infección al vector y diferencias en la respuesta inmune del hospedero humano, lo que favorece la selección de variantes mejor adaptadas en cada brote. En este proyecto se evaluó el fenotipo evasor de la respuesta de interferones de tipo I (IFNs-I) de aislados clínicos de los virus DENV y ZIKV provenientes de muestras sanguíneas de pacientes virémicos de regiones endémicas de México.

Para esto se realizaron preparaciones purificadas de *Flavivirus* a partir de muestras sanguíneas de pacientes virémicos de regiones endémicas de México en células Vero, se titularon mediante la cuantificación de unidades formadoras de placa (PFUs) por inmuncitoquímica, se evaluó el fenotipo evasor de la respuesta de IFNs-I comparando la capacidad de replicación en diferentes líneas celulares con producción endógena variable de IFNs-I por ensayos de inmunofluorescencia y se confirmaron los resultados cuantitativamente realizando curvas de sensibilidad a IFN-I recombinante. El aislado DENV-oax.2016 presenta diferente capacidad de evasión de la respuesta de IFNs-I en comparación con el virus referencia utilizado como punto de comparación (DENV-1 WP), mientras que el aislado ZIKV-oax.2016 tiene capacidad de evasión de IFNs-I similar al virus referencia utilizado como punto de comparación (ZIKV-PRVABC59).

El aislamiento y la caracterización de los aislados silvestres nos permiten comprobar la selección activa de variantes adaptadas a la población mexicana, así como formar parte de la iniciativa de la generación de un banco de aislados de *Flavivirus* seleccionados de la población mexicana, herramienta invaluable para el estudio de la virulencia de aislados mexicanos de *Flavivirus*.

## 2. MARCO TEORICO

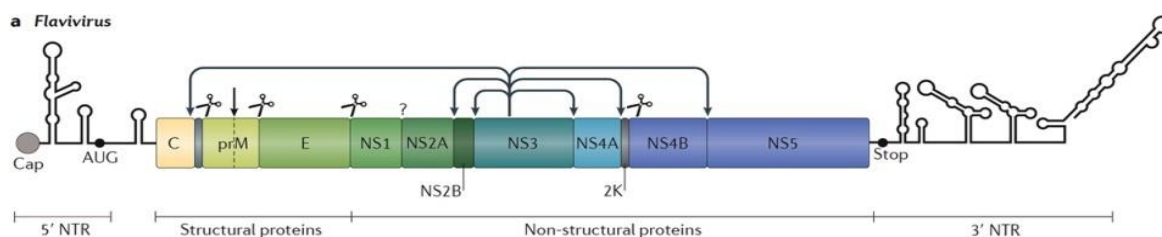
### 2.1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE

Se denominan arbovirus a los virus transmitidos por artrópodos, esta clasificación incluye una amplia variedad de taxones y se encuentran divididos en 6 familias de virus con genoma de ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés) (Go *et al.*, 2014). Dentro de esta clasificación se encuentra el género *Flavivirus* que a su vez se clasifica con base en el vector o ausencia de él en: *Flavivirus* transmitidos por garrapatas (TBFV por sus siglas en inglés), *Flavivirus* transmitidos por mosquitos (MBFV por sus siglas en inglés), *Flavivirus* de vector desconocido (NKFV por sus siglas en inglés), *Flavivirus* no clasificados (NCFV por sus siglas en inglés) y *Flavivirus* específicos de insectos (ISFV por sus siglas en inglés) (Brand *et al.*, 2017). El género *Flavivirus* es el más grande de la familia *Flaviviridae*, con 53 especies reconocidas taxonómicamente, de las cuales más de 40 son patógenos de humanos. Algunos ejemplos incluyen al virus de la encefalitis japonesa (JEV por sus siglas en inglés), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV por sus siglas en inglés), el virus de la fiebre amarilla (YFV por sus siglas en inglés), el virus del Oeste del Nilo (WNV por sus siglas en inglés), ZIKV y DENV (Moureau *et al.*, 2015), estos dos últimos están estrechamente relacionados genética y antigénicamente (Sirohi *et al.*, 2016).

#### 2.1.1 Estructura genómica y protéica de los *Flavivirus*

La partícula viral madura es envuelta y mide aproximadamente 50 nm de diámetro. El genoma viral consiste en una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA por sus siglas en inglés) de aproximadamente 11 kb, que codifica para un sólo marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) flanqueado en sus extremos 5' y 3' por dos regiones no traducidas (UTR por sus siglas en inglés), un Cap tipo I (7Me Gppp 2'OMe) en el extremo 5' que permite el reconocimiento por ribosomas y, a diferencia de los mRNA celulares, carecen de poliadenilación en el extremo 3' (Sirohi *et al.*, 2016). El ORF es directamente traducido como poliproteína, la cual es procesada proteolíticamente co- y postraduccionalmente en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y ocho proteínas

no estructurales (NSPs) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2 K en algunos *Flavivirus*, NS4B y NS5) tanto por proteasas celulares como por la proteasa viral NS2B/NS3 (Bartenschlager *et al.*, 2013) como se observa en la figura I. El genoma viral está contenido en la nucleocápside que a su vez está envuelta por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera y rodeada por 180 copias de homodímeros de la proteína de envoltura (E) (Chambers *et al.*, 1990; Kuno y Chang 2007; Hulo *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2016).



**Figura I. Estructura genómica y proteica de *Flavivirus*.** consiste en una molécula de +ssRNA con dos regiones UTR, un Cap tipo I en el extremo 5', carece de poliadenilación en el extremo 3'. Tiene tres proteínas estructurales (C, prM y E) y ocho proteínas no estructurales (NSPs) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2 K en algunos *Flavivirus*, NS4B y NS5) (Neufeldt *et al.*, 2018).

Las proteínas estructurales forman la partícula viral, participan en la entrada del virus a la célula hospedera, en el ensamblaje y liberación de la progenie viral. La proteína de la cápside (C) consiste en 120 aminoácidos, está involucrada en el empaquetamiento del genoma viral y se une al RNA genómico para formar la nucleocápside (NC). La glicoproteína precursora de membrana (prM) está compuesta de 165 aminoácidos y la glicoproteína de envoltura (E) de 495 aminoácidos, ambas contienen dos dominios transmembranales (Romero-Cabello, 2008). La proteína prM se encuentra únicamente en la partícula inmadura de *Flavivirus* e impide la fusión prematura con las membranas de la célula hospedera, en el trans-Golgi, es procesada proteolíticamente para liberar el péptido pr y la proteína M (formada por 75 aminoácidos) liberando los dominios de la proteína E responsables de la unión celular, la fusión y la entrada (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Shashank *et al.*, 2017).

Las proteínas no estructurales (NSPs por sus siglas en inglés) forman el complejo replicativo (RC por sus siglas en inglés) en la membrana del retículo endoplasmático (ER

por sus siglas en inglés) de la célula hospedera y están implicadas en la evasión de la respuesta innata anti-viral (Shashank *et al.*, 2017; Diamond y Pierson 2015; Pierson y Kielian 2013; Suthar *et al.*, 2013).

De las proteínas no estructurales, la NS1 es altamente conservada entre los *Flavivirus*, su peso molecular oscila entre 46-55 kDa (kilodaltones), dependiendo del grado de glicosilación, NS1 existe como monómero, como dímero (proteína unida a la membrana, mNS1) en la infección inicial, o bien se presenta en la infección tardía como hexámero (proteína secretada, sNS1), aunque se desconoce su función específica, se sabe que es esencial para la replicación viral, posiblemente a través de interacciones con las proteínas transmembranales NS4A y NS4B, además está involucrada en la evasión del sistema inmune, patogénesis y sNS1 es uno de los principales marcadores de la infección viral en circulación utilizada para el diagnóstico. NS1 es reconocida por los receptores de membrana tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés) e inhibe el sistema del complemento de individuos virémicos (Fan *et al.*, 2014).

La proteína NS2 puede procesarse adicionalmente en las proteínas maduras NS2A y NS2B, sin embargo, su función sigue siendo desconocida. NS2A es una proteína hidrofóbica pequeña con dominios transmembranales (TMDs por sus siglas en inglés) con peso molecular de 22 kDa, desempeña un papel crítico en el ciclo de replicación viral y en la evasión de la respuesta inmunitaria innata del hospedero. Los extremos N y C de la NS2A son procesados por una proteasa de la célula hospedera y la proteasa viral NS2B/NS3. Varios estudios demuestran que NS2A puede estar asociada con la regulación de la replicación del genoma viral, en la inhibición de la apoptosis y en la interferencia de la regulación del ciclo celular, además, puede interactuar con el 3' UTR del RNA viral, así como con otros componentes del RC. También se ha observado su participación en el ensamblaje y exocitosis de la progenie viral y en la inducción de efecto citopático (CPE por sus siglas en inglés) en la célula infectada, así como en la modulación de la respuesta de interferones de tipo I (IFNs-I) del hospedero (Kaukinen *et al.*, 2013).

NS2B es una proteína 14 kDa que contiene tres dominios: dos TMDs ubicados en los extremos N-terminal y C-terminal y una región central que actúa como un cofactor de la proteasa viral NS3. La proteína NS3 presenta actividad enzimática de serina proteasa, de

nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y de helicasa de RNA, así procesa proteolíticamente la poliproteína viral en sitios específicos para liberar las proteínas individuales y participa en la replicación del RNA viral (Dalrymple *et al.*, 2015).

La proteína NS4A, al igual NS4B son proteínas con TMDs. La proteína NS4A de 16 kDa, desempeña múltiples funciones en la replicación viral, así como en la interacción virus-célula hospedera; induce la reorganización de la membrana del ER y la autofagia para prevenir la muerte celular facilitando la replicación viral (Zou *et al.*, 2015).

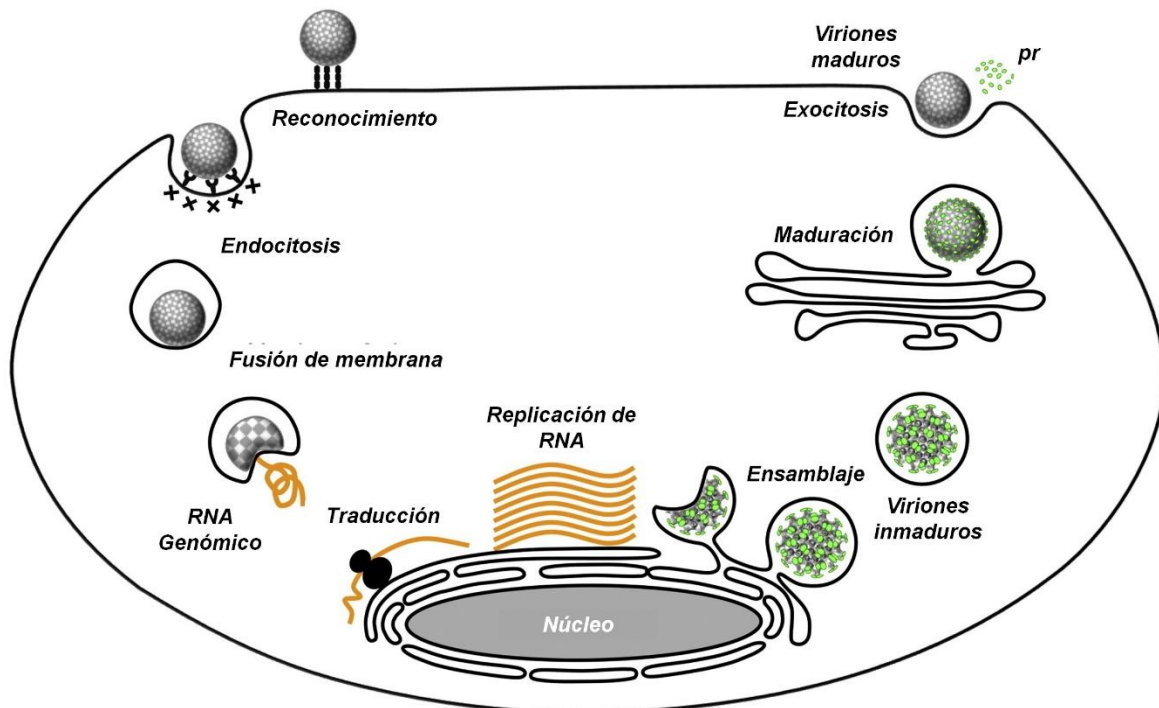
La proteína 2K no está presente en todos los *Flavivirus*, se ha reportado que regula la función de NS4A en la modulación de las alteraciones en la membrana del ER. Por otro lado, la proteína NS4B de 27 kDa, regula la actividad del dominio de ATPasa de NS3 y por interacción con NS1 y modula la replicación viral. Se ha reportado que la expresión de NS4A y B puede bloquear la translocación del factor de transcripción STAT1 inhibiendo la señalización de IFNs-I. La RNA polimerasa dependiente de RNA viral (RdRp por sus siglas en inglés) NS5 es la proteína más conservada entre las NSPs de los *Flavivirus*, pesa aproximadamente 105 kDa, es responsable de la protección, la metilación y la replicación del genoma viral. Contiene un dominio de metiltransferasa (MTasa) N-terminal que metila al RNA viral, mimetizándolo para prevenir el reconocimiento por la célula hospedera y promover la traducción de la poliproteína viral (Lu y Gong, 2017).

Los dos tercios C-terminales de NS5 comprenden el dominio de RdRp, el cual forma un complejo multiprotéico con NS3 y NS2B, para formar el RC, este complejo trimérico es esencial para el establecimiento de las interacciones proteína-proteína y proteína-RNA necesarias para la reacción de polimerización del genoma viral y está presente en el genoma de todos los *Flavivirus* reportados hasta el momento (Egloff *et al.*, 2002).



### 2.1.2. Ciclo replicativo de los Flavivirus

El ciclo replicativo de los Flavivirus comienza cuando la proteína E en la partícula viral madura es reconocida por un receptor celular; esta interacción induce el proceso de endocitosis mediada por receptor. Se han identificado varias moléculas de la superficie celular que funcionan como receptores o co-receptores que favorecen la entrada viral en células susceptibles, algunos receptores reportados son; los receptores de fosfatidilserina (PS) de las familias TIM (inmunoglobulina de células T y dominio de mucina), TIM-1 y TAM (Tyro3, TAM-Axl y Mer), los receptores HSPG (proteoglicano de heparán sulfato) así como DC-SIGN en células dendríticas y macrófagos, además de sus homólogos DC-SIGNR y L-SIGN en hepatocitos y células de ganglios linfáticos respectivamente (Gatherer y Kohl, 2016).



**Figura II. Ciclo replicativo de los Flavivirus.** Los ocho pasos principales del ciclo replicativo son: unión, endocitosis, fusión de membrana, traducción, replicación de RNA, ensamblaje, maduración y liberación (Modificado de Song *et. al.*, 2017).

Alternativamente, los *Flavivirus* como el DENV pueden ser opsonizados por anticuerpos no neutralizantes o subneutralizantes, permitiendo así la entrada en células con receptores Fc, tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas, esta estrategia de internalización se conoce como facilitamiento mediada por anticuerpos (ADE por sus siglas en inglés) (Flipse *et al.*, 2016) y se ha asociado a las manifestaciones clínicas severas por infección por dengue (Leah *et al.*, 2017).

Una vez en la endosoma celular, la disminución de pH desencadena cambios conformacionales en la proteína E exponiendo el péptido fusogénico, lo que induce la fusión de la membrana viral con la endosomal, favoreciendo la entrada de la nucleocápside al citoplasma y la liberación del genoma viral (Figura II).

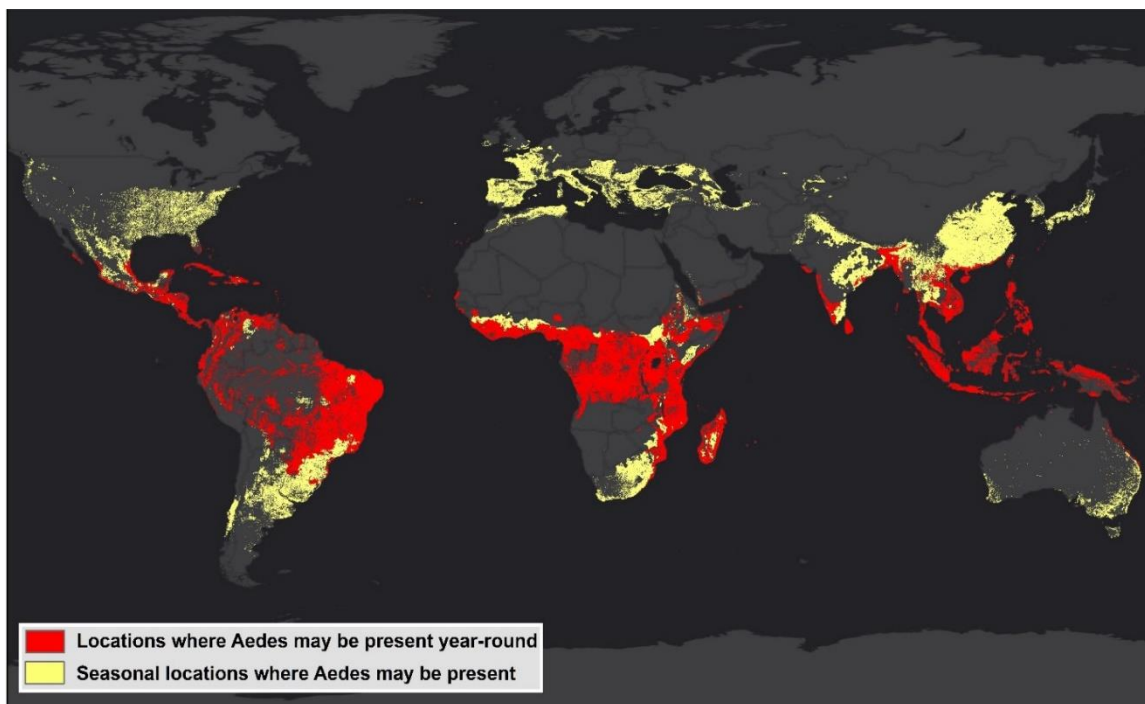
El genoma viral puede ser traducido inmediatamente a poliproteína en el retículo endoplásmico, la cual es procesada post-traduccionalmente en proteínas maduras por la proteasa viral NS2B-NS3 y proteasas celulares. La RNA polimerasa viral NS5, el genoma viral y otras proteínas NS forman el RC para la síntesis del intermediario replicativo; (-)ssRNA que servirá como molde para la síntesis de múltiples copias de (+)ssRNA que pueden ser traducidas o empaquetadas como nuevos genomas virales. En general las RdRp virales tienen fidelidad de replicación baja, lo que genera altas tasas de error que se estiman de entre  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  errores por nucleótido copiado, generando así una "nube" de variantes o cuasiespecies (Lauring y Andino, 2010).

Las altas tasas de mutación dan como resultado una alta tasa de variantes genéticamente distintas dentro de la población de *Flavivirus* durante los ciclos de replicación, característica crítica para la patogénesis en los hospederos infectados (Kurosu, 2011). La proteína C interacciona con el genoma viral y forma la nucleocápside. Los viriones inmaduros se transportan a través de la vía secretora trans-golgi, donde adquieren la envoltura, posteriormente ocurre glicosilación de la proteína E y el procesamiento proteolítico de la proteína prM mediado por la enzima celular furina, generando la forma madura de la proteína M, los viriones maduros son transportados a la membrana plasmática y liberados por exocitosis (Paranjape, 2010); (Villamarin, 2016).

## 2.2 PRINCIPALES VECTORES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los virus ZIKV y DENV son actualmente los *Flavivirus* con mayor circulación en regiones tropicales y subtropicales. Ambos son transmitidos a los humanos por la picadura de los mosquitos hembra hematófagos del género *Aedes*; sus principales vectores durante los ciclos urbanos son las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y al compartir al vector, es frecuente que estos virus co-circulen las mismas regiones geográficas (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

Según una proyección global (Figura III) basada en una técnica de mapeo de idoneidad, se ha propuesto que las áreas geográficas donde los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* circulan durante todo el año corresponden a América Central, el Caribe y el norte de América del Sur; la costa de África occidental, central, oriental costera y Madagascar; partes de la costa de la India y el sureste asiático, Indonesia, Malasia y las Filipinas y naciones insulares del Pacífico. Por otro lado, la transmisión estacional es posible en un área significativamente más grande, que incluye gran parte del sureste de los Estados Unidos y el norte de México, así como algunas partes de Sudamérica, como



**Figura III. Distribución geográfica de los vectores para DENV y ZIKV.** Mapa global de las regiones donde existe la presencia estacional (amarillo) y presencia durante todo el año (rojo) de mosquitos hematófagos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Attaway *et al.*, 2017).

la costa chilena; gran parte del sur de Europa y de África del Norte; la costa sureste de África; gran parte de Asia meridional y Asia oriental, incluida China, Corea y Japón y partes de Australia y Nueva Zelanda (Attaway *et al.*, 2017).

### *2.2.1 Epidemiología en México*

La Secretaría de Salud a través de la Dirección General de Epidemiología y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportan que en México se han confirmado 12,809 casos autóctonos de infección por ZIKV desde 2015; de los cuales 7,120 son casos confirmados en mujeres embarazadas hasta el 18 de marzo de 2019 y 72,673 60,329 casos de infección por DENV confirmados desde 2015 hasta la semana epidemiológica 12 de 2019.

## **2.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA E HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE Y ZIKA**

La forma más común de transmisión de los virus DENV y ZIKV es la transmisión horizontal (Figura IV), ésta ocurre cuando el mosquito hembra se alimenta de la sangre de un hospedero infectado en periodo de viremia, las partículas virales infectan células del intestino medio del mosquito para después diseminarse a otros tejidos hasta llegar a las glándulas salivales para completar el ciclo al alimentarse de otro hospedero susceptible (Briant *et al.*, 2014).

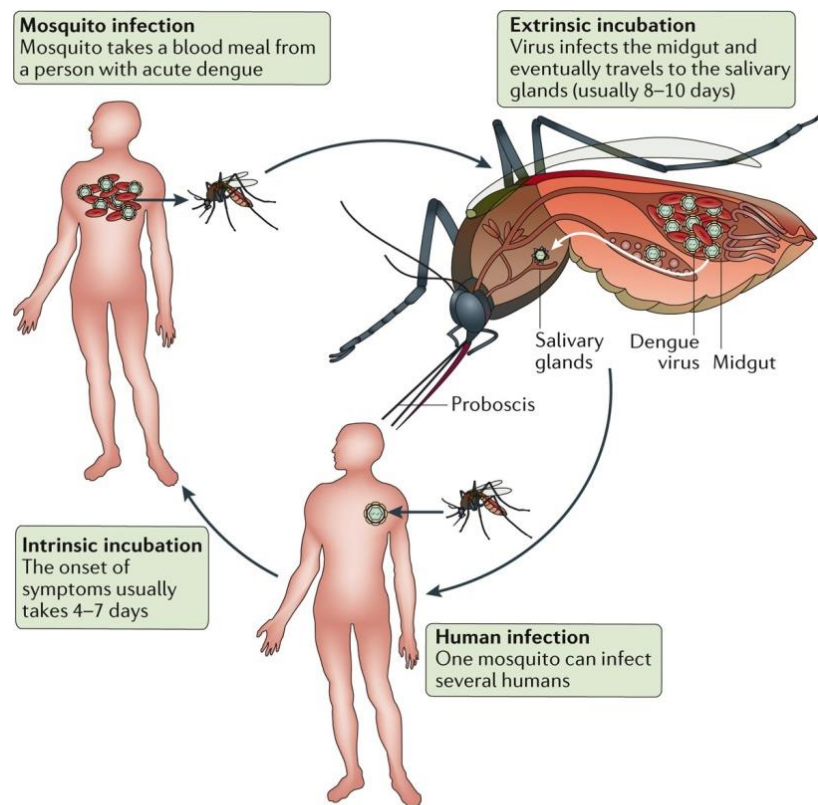
### *2.3.1 Presentaciones clínicas de la infección con DENV*

Existen cuatro serotipos del DENV, genética y antigénicamente relacionados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Cáceres, 2003). En 1997 la OMS clasificó a la enfermedad del dengue con base en dos fenómenos patológicos: se designó a la fiebre por dengue (DF) como una enfermedad febril inespecífica y a las formas severas de la enfermedad como fiebre hemorrágica del dengue y síndrome de choque por dengue (FHD / DSS). En 2009 la OMS modificó esta clasificación y en la actualidad se definen las presentaciones clínicas del dengue como: dengue con o sin signos de alarma (DCSA y DSSA) y dengue grave (DG) (CDC, 2013).

La infección por cualquiera de los cuatro serotipos puede inducir una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde asintomática, sintomatología similar a un resfriado

común o bien acompañada de fiebre elevada, náuseas, dolor retro-orbital, cefalea, sarpullido, así como mialgia y artralgia. En el DCSA y DG se presentan manifestaciones clínicas como trombocitopenia y pérdida de plasma, lo que conduce a insuficiencia respiratoria, hemorragia interna y al deterioro de varios órganos, manifestaciones que pueden tener un resultado letal (Bhatt *et al.*, 2013).

La enfermedad del dengue también se puede dividir en tres fases separadas: la fase aguda o febril que está caracterizada por fiebre alta y viremia, la fase crítica, la cual se distingue por la pérdida de plasma en las cavidades abdominal y pleural, y la fase de convalecencia que implica tanto el cese de la pérdida de plasma como la reabsorción de fluidos filtrados (Guzmán *et al.*, 2016).



Nature Reviews | Disease Primers

**Figura IV. Ciclo urbano de *Flavivirus* en humanos y mosquitos.** Un mosquito *Aedes* puede infectarse al alimentarse de una persona en la fase virémica de la infección. Durante la fase extrínseca del ciclo, los virus del dengue primero infectan las células del intestino medio del mosquito y otros tejidos antes de diseminarse a las glándulas salivales. Un mosquito infectado puede transmitir el virus del dengue a varios humanos mientras se alimenta o intenta alimentarse. Una vez infectado, toma un promedio de 4 a 7 días para que aparezcan manifestaciones clínicas así como para ser capaz de transmitir el virus del dengue a un nuevo mosquito. Tanto las personas sintomáticas como las asintomáticas pueden transmitir el virus del dengue a los mosquitos (Guzman *et al.*, 2016).

### 2.3.2 Presentaciones clínicas de la infección con ZIKV

El virus Zika fue aislado por primera vez de la sangre de un mono Rhesus (*Macaca mulatta*) durante el programa centinela en el bosque Zika de Uganda en 1947 (Dick *et al.*, 1952), posteriormente de seres humanos en Nigeria durante los estudios realizados en 1968 y durante 1971–1975 (Hayes, 2009). El análisis filogenético ha identificado tres linajes de ZIKV, los genotipos de Africano oriental, Africano occidental y Asiático, lo que sugiere la emergencia inicial en África oriental y su posterior propagación a otras regiones, además, la inmunidad humoral generada contra un genotipo de ZIKV proporciona protección cruzada contra genotipos heterólogos, lo que sugiere la existencia de un solo serotipo ZIKV (Calvet *et al.*, 2016).

En el humano, el tiempo desde la infección hasta la aparición de manifestaciones clínicas varía de 3 a 14 días, con un promedio de 4-7 días (Guzmán *et al.*, 2016). La infección por ZIKV se asocia con una enfermedad autolimitante, las manifestaciones clínicas son similares a otras enfermedades causadas por virus transmitidas por mosquitos como el virus Chikungunya (CHIKV) o DENV. Los síntomas relacionados con una infección causada por ZIKV son: fiebre, conjuntivitis, erupción macular o papular, artralgia, mialgia, cefalea, dolor retro-orbital, edema, vómitos y debilidad (Shashank *et al.*, 2017). Se ha observado que el ZIKV es neurotrópico y, a diferencia de otros *Flavivirus*, atraviesa la barrera placentaria causando infecciones cerebrales durante la gestación, lo que resulta en defectos congénitos severos incluyendo microcefalia, resultados adversos en el parto e incluso aborto espontáneo en mujeres embarazadas infectadas (Sirohi *et al.*, 2016), además se ha observado que ZIKV es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica infectando neuronas y células de la glía y se le asocia con complicaciones clínicas como el síndrome Guillain-Barre (GBS por sus siglas en inglés) y trombocitopenia grave en adultos (Cao-Lormeau, 2016). El GBS es una neuropatía autoinmune que causa debilidad muscular, parálisis y muerte como consecuencia de la desmielinización isquémica inmunomediada de las neuronas del sistema nervioso periférico, inflamación y compromiso estructural de la barrera hematoencefálica (Fontes *et al.*, 2016).

En pacientes infectados con ZIKV, se ha detectado en suero, saliva, orina, líquido seminal y vaginal, estudios recientes muestran que el virus ZIKV, además de la transmisión vectorial y congénita, puede transmitirse por vía sexual (Gao *et al.*, 2016).

En la historia natural de la infección por *Flavivirus* se han identificado tres fases: la fase inicial referida a la infección, seguida por la fase de diseminación a órganos viscerales y la amplificación viral periférica y finalmente neuroinvasión (Saif *et al.*, 2018).

Los virus DENV y ZIKV tienen tropismo celular dinámico ya que están adaptados para alternar entre primates y sus vectores, por lo que son capaces de infectar una gran variedad de linajes celulares. *In vivo*, las células susceptibles y permisivas a la infección por DENV son principalmente células dendríticas, pero también existen células residentes de la piel como queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos dérmicos, así como células de otras regiones anatómicas como los hepatocitos, células de Kupffer, neuronas y células de la microglía que son susceptibles y permisivas a la infección por estos *Flavivirus* (Bustos-Arriaga *et al.* 2011) (Salazar, 2014) (Briant *et al.*, 2014) (Shashank, 2017), (Hamel *et al.*, 2015). De manera adicional, el ZIKV es neurotrópico tanto para neuronas del sistema nervioso central como periférico, tales como células madre neurales, células precursoras de oligodendrocitos, células de la cresta neural craneal, neuronas y astrocitos; células de la retina y el nervio óptico como células de la microglía (Saif *et al.*, 2018). Ya que la infección por el ZIKV es transmitida de forma vertical durante el embarazo, se ha propuesto que el virus atraviesa la barrera placentaria infectando células placentarias como macrófagos placentarios (células de Hofbauer) y trofoblastos, infectando el tejido nervioso del producto, lo que ocasiona alteraciones en el desarrollo cerebral y otras alteraciones congénitas (Fontes *et al.*, 2016).

#### **2.4. RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA *FLAVIVIRUS***

Los virus son patógenos diversos y adaptables a los que se enfrenta el sistema inmunológico del hospedero, por lo tanto, representan una seria amenaza para la salud humana. Durante la infección con *Flavivirus* y después del periodo de replicación en el sitio de inoculación primario, el virus se disemina por la migración de células dendríticas infectadas a través de la circulación linfática. A partir de esta etapa inicia el periodo de viremia de 1 a 5 días después de la inoculación (Hamel *et al.*, 2015). La replicación del

virus induce la activación de la respuesta inmune innata antiviral por parte del hospedero. La primera respuesta del sistema inmunológico innato en la célula hospedera es la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés) y la consecuente producción de citocinas antivirales de la familia de los interferones (IFNs) de tipo I (Shashank *et al.*, 2017).

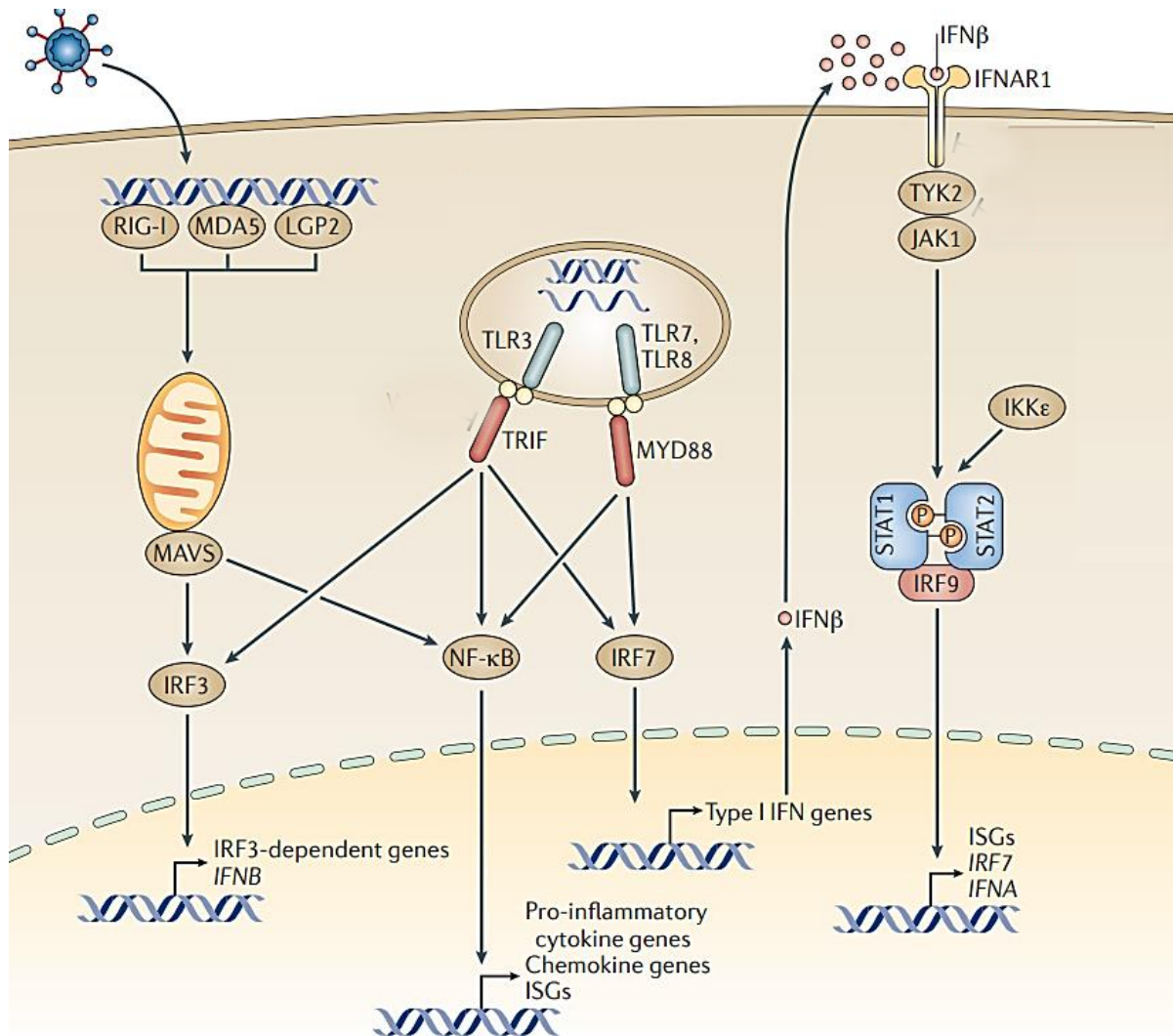
#### 2.4.1 Detección de PAMPs virales por los PRRs

El RNA de doble cadena (dsRNA), un intermediario de replicación viral, es el principal PAMP flaviviral (Nasirudeen *et al.*, 2011), se han identificado dos familias de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) que participan en la detección de PAMPs virales; los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés) y las helicasas tipo RIG-I (RLRs por sus siglas en inglés) cuyos miembros son la proteína citoplásmica inducible por el ácido retinoico I (RIG-I por sus siglas en inglés), el antígeno de diferenciación de melanoma 5 (MDA5 por sus siglas en inglés), también conocido como IFIH1 y la molécula nombrada laboratorio de genética y fisiología (LGP2 por sus siglas en inglés) (Rodríguez-Madoz *et al.*, 2010) (Bowie y Unterholzner, 2008) (Hotz, *et al.*, 2015).

RIG-I se encuentra autoinhibido en estado basal por la interacción de sus dominios de reclutamiento y activación de caspasas en tándem (CARD por sus siglas en inglés) con el dominio helicasa, y puede activarse por cambios conformacionales mediante el acoplamiento del +ssRNA flaviviral. MDA5 es regulada *in vivo* por la ubiquitinación, la fosforilación y la asociación directa o indirecta de sus dominios CARD o con otros mediadores antivirales y LGP2 es un regulador negativo de la señalización de los receptores tipo RIG-I (RLRs por sus siglas en inglés) ya que cuenta con dominio de helicasa para la detección, pero no presenta dominios CARD para la señalización (Rodríguez *et al.*, 2014).

El reconocimiento y la unión de los ligandos de dsRNA a RIG-I, MDA5 y LGP2 inducen la activación de estos receptores a través de hidrólisis de ATP, seguida de un cambio conformacional, oligomerización y la posterior redistribución subcelular, tras esta redistribución, en la figura V, se observa como RIG-I y MDA5 se unen a la proteína adaptadora señalización antiviral mitocondrial (MAVS por sus siglas en inglés), la





**Figura V. Respuesta inmune innata celular intrínseca a la infección por *Flavivirus*.** La unión de dsRNA a los RLRs induce su activación a través de hidrólisis de ATP, seguida de un cambio conformacional, oligomerización y redistribución, RIG-I y MDA5 se unen a MAVS, los factores de transcripción se activan y translocan al núcleo, IRF3 y NF-κB inducen la expresión de genes regulados por estos factores de transcripción, incluidos los de IFNs-I. Por su parte TLR3, TLR7 y TLR8 señalizan a través de TRIF y MYD88 para promover la expresión génica dependiente de NF-κB, IRF3 e IRF7. El IFN-β se secreta de la célula infectada, se une de forma autocrina y paracrina a su receptor compartido IFNAR1, lo que lleva a la fosforilación de TYK2 y JAK1 y a la formación del complejo ISGF3 que incluye STAT1, STAT2 e IRF9 el cual se traslada al núcleo y amplifica la inmunidad intrínseca en la célula mediante la promoción de la expresión de ISGs y varios subtipos de IFN-I.

formación de la sinapsis de señalización con MAVS controla la activación y translocación nuclear de las familias de factores de transcripción latentes: factores regulados por interferón (IRFs por sus siglas en inglés) y el factor nuclear-κB (NF-κB por sus siglas en inglés) que inducen la expresión de genes con sitios consenso para estas familias de factores de transcripción en sus promotores, incluidos los genes de los IFNs-I. Por su parte TLR3, TLR7 y TLR8 señalizan a través de sus proteínas adaptadoras TRIF

(adaptador que induce IFN $\beta$  que contiene el dominio TIR) y MYD88 (diferenciación mieloide 88) a promover la expresión génica dependiente de NF- $\kappa$ B, IRF3 e IRF7 (Uno and Ross *et al.*, 2018); (Suthar *et al.*, 2013).

#### 2.4.2 Interferones de tipo I

En humanos, la familia de los IFNs-I incluyen a 14 interferones  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), un interferón  $\beta$  (IFN-  $\beta$ ), interferón  $\kappa$  (IFN-  $\kappa$ ), interferón  $\omega$  (IFN-  $\omega$ ) e interferón  $\epsilon$  (IFN- $\epsilon$ ) (Capobianchi *et al.*, 2015). Los IFNs-I son producidos en respuesta al reconocimiento de PAMPs por sus respectivos PRRs.

Se ha propuesto que el dsRNA es reconocido en el compartimento endosomal por TLR3, TLR7 y TLR8 los cuales señalizan a través de sus proteínas adaptadoras TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR que induce IFN $\beta$ ), mientras que en el compartimiento citoplásmico el RNA es reconocido por RIG-I MDA5 y LGP2, esta interacción induce hidrólisis de ATP, seguido de un cambio conformacional en las RLRs, su oligomerización y la posterior redistribución subcelular a las membranas mitocondriales donde RIG-I y MDA5 interactúan con la proteína adaptadora MAVS (señalización antiviral mitocondrial), estos dos procesos inducen la activación y la translocación nuclear de los factores de transcripción latentes; los factores reguladores de interferón 3 y 7 (IRF3 e IRF7) y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Rodríguez-Madoz *et al.*, 2010).

En el núcleo, los factores de transcripción IRF3, IRF7 y NF- $\kappa$ B se unen a los sitios consenso en los promotores de genes de IFNs-I, y a los elementos de respuesta estimulados con interferón (ISRE por sus siglas en inglés), localizados en las regiones promotoras de varios genes estimulados por interferón (ISGs por sus siglas en inglés) (Cedillo-Barrón *et al.*, 2014).

Una vez traducidos y secretados, los IFNs-I tienen actividad tanto autocrina como paracrina estableciendo un microambiente antiviral, así como modulando la duración e intensidad de la respuesta inmunológica adaptativa (Bustos-Arriaga, 2011). En la figura V se ejemplifica como los IFNs-I interactúan con su receptor común IFNAR, que se compone de las subunidades IFNAR1 e IFNAR2 que activan las proteínas tirosina cinasas asociadas al receptor de la cinasa Janus 1 (JAK1) y tirosina cinasa 2 (TYK2), que

fosforilan los factores de transcripción citoplásmicos latentes; el transductor de señal y activador de la transcripción 1 y 2 (STAT1 y STAT2). Los STAT1 y STAT2 fosforilados en residuos de tirosina, dimerizan y se translocan al núcleo, donde se ensamblan con el factor regulador de IFN 9 (IRF9) para formar un complejo trimolecular llamado factor genético estimulado por IFN 3 (ISGF3 por sus siglas en inglés), ISGF3 que se une a secuencias de DNA en regiones promotoras de ISRE, activando así directamente la transcripción de ISGs, por lo tanto, la señalización canónica de IFNs de tipo I induce un subconjunto distinto de miles de ISG con secuencias ISRE en sus promotores. Los productos proteicos de los ISGs restringen la replicación viral por varios mecanismos, algunos ejemplos incluyen la inhibición de la transcripción, traducción y replicación viral, la degradación de ácidos nucleicos virales y la alteración del metabolismo lipídico celular (Nan *et al.* 2017). Algunos ejemplos de ISGs son la 2'5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y la ribonucleasa L (RNasaL), la proteína cinasa dependiente de dsRNA inducida por IFN (PKR por sus siglas en inglés) la proteína de resistencia a los myxovirus (Mx por sus siglas en inglés) y la adenosin desaminasa específica de RNA (ADAR por sus siglas en inglés) que están implicados en mecanismos antivirales que interfieren con el ciclo de replicación viral a diferentes niveles (Suthar *et al.*, 2013). De igual manera los IFNs-I inducen la transcripción de los genes de RIG-I y MDA5, algunos microRNAs y proteínas de la familia de motivos tripartito (TRIM por sus siglas en inglés), todos estos involucrados en la amplificación y la regulación de la respuesta de IFNs-I (Ivashkiv y Donlin, 2013). Se sabe entonces que el efecto antiviral de IFNs-I está mediado por ISGs, que interrumpen varias etapas de la replicación viral, incluidos los *Flavivirus*.

Estudios de sobreexpresión genética y reducción han informado que varios ISG humanos, incluidas las proteínas transmembrana inducibles por interferón (IFITM), ISG15, ISG20, Viperin y BST2, tienen efectos supresores contra la infección por virus *in vitro*, además, un reciente estudio utilizando una biblioteca de ISGs que comprende más de 350 genes reveló que al menos 10 ISGs eran potentes inhibidores celulares de la replicación de DENV ya que modulan la infección en la etapa temprana o tardía de la replicación del virus (Suzuki *et al.*, 2016).

### 2.4.3 ISGs con actividad contra los virus DENV y ZIKV

Los ISGs restringen la replicación viral por varios mecanismos, la gran mayoría de estos no se conocen, sin embargo, algunos han sido caracterizados y se sabe que productos proteicos de ISGs tienen actividad antiviral a nivel de entrada, desnudamiento, transcripción traducción, replicación, ensamblaje y salida. Algunos ejemplos incluyen a miembros de la proteína transmembrana inducida por IFN (IFITM), los cuales inhiben los eventos de fusión endocítica del DENV y muy probablemente de otros *Flavivirus*, la proteína de resistencia al mixoma 1 (Mx1) que inhibe una amplia gama de virus al bloquear el tráfico endocítico de las partículas entrantes y la eliminación de nucleocápside. Algunos ISGs degradan el RNA viral o bloqueando la traducción de RNAm virales, como la 2', 5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y RNasaL, las proteínas inducidas por IFN con repeticiones tetratricopeptídicas (IFIT) inhiben la traducción de proteínas y también se han implicado en la degradación del RNA viral incluidos algunos *Flavivirus*. Las proteínas TRIM inhiben la transcripción viral, la replicación o el tráfico de proteínas virales a la membrana plasmática. Particularmente se sabe que TRIM25 inhibe la activación de STAT2, impidiendo la transcripción de los ISGs en respuesta a la infección, manteniendo bloqueada la respuesta antiviral en la etapa de inducción en fases tardías. Otros ISGs pueden inhibir la traducción, replicación o salida viral. Se ha demostrado el ISG Teterina impide la segmentación de la membrana plasmática en la salida, este mecanismo es conservado para algunos *Flavivirus* (Schneider *et al.*, 2014).

## 2.5. MECANISMOS DE LA EVASIÓN A LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR *FLAVIVIRUS*

Los virus son parásitos intracelulares obligados que dependen de las células hospederas para replicar. El tropismo diverso de los *Flavivirus* les confiere una gran capacidad de interacción dinámica con la maquinaria celular por lo que han evolucionado estrategias sofisticadas utilizando proteínas del hospedero para su ciclo replicativo, secuestrando y utilizando factores celulares para la entrada, la replicación, propagación y subversión de la respuesta inmunológica innata (Salazar, 2014).

Los *Flavivirus*, han desarrollado una amplia gama de mecanismos de inhibición de la producción y activación de la respuesta de IFNs-I, algunos ejemplos son la

compartimentalización del intermediario replicativo de RNA de doble cadena en membranas del retículo endoplásmico (ER) para disminuir la detección por las helicasas tipo RIG-I, la metilación del Cap para mimetizar a los mRNA celulares, la proteólisis de los reguladores de la activación de la transcripción de IFNs-I por la proteasa viral NS2B/NS3 y la desestabilización del factor de transcripción STAT2 por la proteína viral NS5 para inhibir la activación transcripcional de los ISGs (Hertzog *et al.*, 2018). Uno de los mecanismos de evasión de los IFNs-I más efectivo durante la infección con *Flavivirus* es la acumulación del RNA flaviviral subgenómico (sfRNA), un RNA no codificante derivado de la degradación incompleta de la región 3'UTR del genoma viral por la exonucleasa celular 5'-3' XRN1 (Moon *et al.*, 2012). Se ha demostrado la importancia del sfRNA en la inhibición de la respuesta dependiente de IFNs-I por diversos mecanismos dependiendo del *Flavivirus*; inhibición de la fosforilación de IRF-3, inhibición de los reguladores positivos críticos de la respuesta de IFNs-I G3BP1, G3BP2 y CAPRIN1 (Bidet *et al.*, 2014), así como la unión a TRIM25 para interferir con su desubiquitinación, bloqueando la señalización de RIG-I para la transcripción de los genes de IFNs-I (Manokaran *et al.*, 2015).

En experimentos *in vitro* se ha observado que en la infección de células dendríticas humanas con *Flavivirus* se inhibe la fosforilación de IRF-3 debido a la acumulación de sfRNA, inhibiendo la transcripción de los genes de IFNs-I y favoreciendo la replicación viral (Rodríguez-Madoza, 2010). La alta capacidad de adaptación y la selección activa de variantes con mayor capacidad de evasión de la respuesta innata se ha demostrado experimentalmente; Manokaran y colaboradores demostraron que el “fitness” epidemiológico en aislados de DENV de Puerto Rico y Nicaragua era dependiente de su capacidad de evasión de la respuesta de IFNs-I y que este fenotipo evasor era a su vez dependiente de la acumulación de sfRNA. En este estudio se observó que el sfRNA de estos aislados, interactúa con TRIM25, proteína necesaria para la señalización de IFNs-I, esta capacidad del sfRNA en los aislados de DENV, favoreció el desplazamiento geográfico de virus circulantes con menor fitness. (Manokaran *et al.*, 2015).

Se ha observado que este mecanismo de acumulación de sfRNA, también ocurre en aislados del ZIKV; Donald y colaboradores, demostraron que la cantidad de sfRNA

acumulado en células infectadas con un aislado brasileño de ZIKV correlacionaba con la capacidad de evasión de los IFNs-I, lo que sugiere un mecanismo conservado de selección de variantes con mayor fitness epidemiológico dependiente de la evasión de la respuesta de IFNs-I entre *Flavivirus* (Donald, *et al.*, 2016). Este fenotipo de evasión aunado a la baja fidelidad de la RdRp flaviviral les confieren ventajas evolutivas durante la selección de variantes durante los brotes.

### 2.5.1 Antecedentes directos

La selección de variantes de *Flavivirus* en una nube de mutantes es dependiente de la respuesta inmunológica del hospedero, por lo que la presión evolutiva a la que los *Flavivirus* son sometidos en las diversas regiones endémicas es diferente debido a que la diversidad genética de las poblaciones influencia la intensidad y calidad de la respuesta inmunológica contra patógenos endémicos regionales (Quach y Quintana-Murci, 2017). México es uno de los países con mayor diversidad genética del planeta. Se ha demostrado que la estratificación genética es dependiente del aislamiento de las poblaciones, por lo que la divergencia entre grupos étnicos es alta, con un gradiente de combinación en la población mestiza moderna dependiente de la región geográfica. Esta estructura genética es de gran relevancia para el estudio de la respuesta inmunológica contra patógenos endémicos en nuestro país (Moreno Estrada, 2014). La selección de variantes de *Flavivirus* seleccionados en población Mexicana no ha sido explorada, la dinámica de vigilancia actual también limita el alcance de la evidencia científica que se puede generar en el campo de la epidemiología genética de DENV y ZIKV en nuestro país, la baja accesibilidad a aislados de *Flavivirus* mexicanos para su estudio fomenta que la evidencia científica sea generada utilizando aislados históricos o incluso virus referencia adaptados al laboratorio provenientes de otras regiones geográficas como modelo del virus. La selección de variantes genéticas podrían ser la una explicación de la variabilidad entre la severidad de los brotes tanto en México como en otros países, así como de la distribución cíclica de los cuatro serotipos de DENV en nuestro país.

### **3. HIPÓTESIS**

Aislados de DENV y ZIKV circulantes en el estado de Oaxaca en la temporada 2016, presentan diferente fenotipo de evasión de la respuesta de IFNs-I en comparación con virus adaptados al laboratorio.

### **4. OBJETIVOS**

Caracterizar el fenotipo evasor de la respuesta de IFNs-I de aislados de virus DENV y ZIKV obtenidos de pacientes con cuadro clínico característico de infección por arbovirus del estado de Oaxaca en la temporada 2016 y compararlo con el fenotipo de virus referencia aislados en otras regiones geográficas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Líneas celulares

Para el estudio se utilizaron las líneas celulares C6/36 (ATCC® CRL-1660™) derivadas de *Aedes albopictus*, las cuales se conservaron con medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico-antimicótico, 1% de vitaminas, 1% glutamina, 1% piruvato, a 34 °C, Vero (ATCC® CCL-81™) provenientes de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, las cuales se mantuvieron con medio de cultivo RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico-antimicótico, 1% glutamina a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y la línea de fibroblastos dérmicos provenientes de prepucio humano HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™), las cuales se mantuvieron con medio de cultivo DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico-antimicótico, 1% glutamina a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2. Amplificación y purificación de preparaciones virales

Se realizaron cultivos de células Vero en botellas de cultivo con medio base (RPMI) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibiótico-antimicótico. Las células se mantuvieron a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, al llegar a confluencia de 90%, la monocapa se inoculó con una semilla del virus referencia correspondiente, DENV-1 WP y ZIKV PR con clave de acceso a GenBank AY145121.1 y KX377337.1 respectivamente. Se incubaron durante 5-6 días, dependiendo del virus, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior al tiempo de infección, se clarificó el sobrenadante por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se filtró con una unidad con tamaño de poro de 0.22µm, el filtrado se crio-protegió con SPG (sacarosa-fosfato-glutamato) y se fraccionó en microtubos en volúmenes de 100-150 µl que se almacenaron a -70°C para su posterior cuantificación y caracterización. Para el caso de las muestras obtenidas de pacientes con sospecha de infección por *Flavivirus*: DENV-1 Oax.2016 fue obtenida del suero de un varón de 26 años, el cual presento sarpullido y fue diagnosticado clínicamente con infección por ZIKV y en una segunda opinión por CHIKV, ZIKV Oax.2016 fue obtenida del suero de una mujer de 25 años y que no fue diagnosticada clínicamente, pero presentaba manifestaciones clínicas de infección por



*Flavivirus*. Se utilizaron células C6/36 con medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico-antimicótico, 1% de vitaminas, 1% glutamina, 1% piruvato, a 34 °C, al llegar a confluencia de 90%, la monocapa se inoculó la monocapa con diluciones 1:40 del suero y se realizaron pases ciegos, utilizando el efecto citopático provocado en las células como indicador de replicación viral. Posterior al tiempo de infección, se clarificó el sobrenadante por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se filtró con una unidad con tamaño de poro de 0.22µm, el filtrado se crio-protegió con SPG (sacarosa-fosfato-glutamato) y se fraccionó en microtubos en volúmenes de 100-150 µl que se almacenaron a -70°C para su posterior cuantificación y caracterización fenotípica.

### *5.3. Cuantificación unidades formadoras de placas (UFP) por inmuncitoquímica*

Se realizaron cultivos de células Vero en placas de 24 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y células C6-36 a 34°C para infectarlas con diluciones decimales seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) de DENV-1 WP, ZIKV PR, DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016, después de una hora de agitación se adicionó a cada pozo medio semisólido overlay preparado con metilcelulosa al 1.5% suplementado con suero fetal bovino al 2%, antibiótico-antimicótico al 1% y medio base (RPMI), se incubaron durante 5 días. Para la tinción de las monocapas se fijó la monocapa con metanol al 80%, a continuación se agregó buffer de bloqueo (5% de leche en PBS) enseguida se adicionó un anticuerpo primario D1-4G2-4-15 (ATCC ® HB-112™) 1:2000, la placa se incubó a 37°C durante una hora, posteriormente se adiciona un anticuerpo secundario acoplado a HRP y se revelan las placas agregando sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KPL), finalmente se cuentan las UFP manualmente.

### *5.4. Evaluación del fenotipo de evasión de IFNs-I*

Se realizó una evaluación inicial del fenotipo evasor de la respuesta de IFNs-I comparando la capacidad de replicación en diferentes líneas celulares. Utilizamos la línea de fibroblastos dérmicos (HFF), linaje conocido por ser potentes productores de IFNβ en respuesta a la infección por DENV (Cheol *et al.*, 2016) así como células Vero que carecen de la señalización dependiente de IRF3, necesaria inducir la transcripción de los genes de interferones de tipo I (Chew *et al.*, 2009).

Se cultivaron células Vero y HFF-1 en cubreobjetos de vidrio, después de 24 h, las monocapas se infectaron con los virus referencia, DENV-1 WP y ZIKV PR y así como con las preparaciones purificadas de los aislados DENV1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016. Posterior al tiempo de infección (2, 4 y 6 días) se realizó inmunofluorescencia intracelular; las células se fijaron con *p*-formaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, enseguida las células se permeabilizaron con 0,1% Triton x 100-Gelatina en PBS. Una vez fijada y permeabilizada, la monocapa celular se incubó con la dilución 1:400 del anticuerpo primario D1-4G2-4-15 (ATCC ® HB-112™) por 120 minutos seguido del anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 560 (invitrogen) durante 60 minutos, por último, el núcleo se contrastó con DAPI (1 mg/ml) en PBS durante 10 minutos, los cubreobjetos se colocaron en portaobjetos con medio de montaje (ProLong Gold, invitrogen) y las muestras se analizaron en el microscopio confocal SP-8 (Leica). Posteriormente se cuantificó la capacidad evasora de la respuesta de IFNs-I realizando curvas de sensibilidad a IFN-I humano recombinante (IFN  $\alpha$  A/D, SIGMA). Brevemente; células Vero fueron pre-tratadas con IFN $\alpha$  recombinante a diferentes concentraciones: 10, 100 y 1000 UI/mL y 16h post-tratamiento se infectaron tanto con los virus referencia como con los aislados mexicanos del serotipo correspondiente, se recolectaron sobrenadantes de estos cultivos infectados cada 24 horas post infección durante 6 días y se titularon las PFUs por inmunocitoquímica.

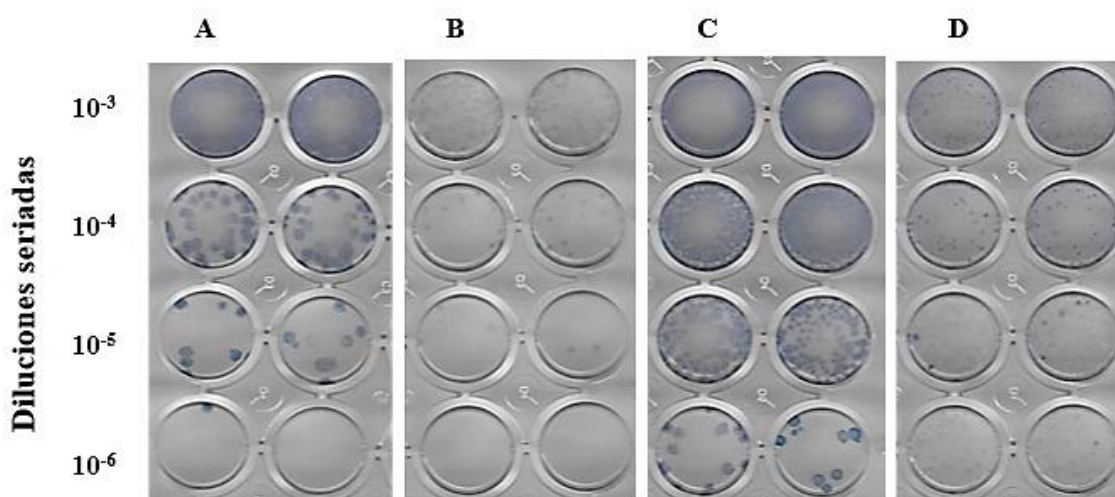
### 5.5. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos del análisis semicuantitativo del fenotipo evasor de IFN-I entre los virus referencia y aislados clínicos fueron analizados por prueba *t* no paramétrica de Mann-Whitney.

Los resultados obtenidos de las curvas de sensibilidad a IFN-I humano recombinante se compararon por prueba de ANOVA de dos factores y múltiples comparaciones, los cuales se expresan en porcentaje de reducción de la infección tomando como 100% el título viral en ausencia de IFN- $\alpha$ . Se requirió  $\alpha$  de  $P < 0.5$  con intervalo de confianza de 95% en donde \*  $< 0.05$ , \*\*  $< 0.005$ , \*\*\*  $< 0.0005$  y \*\*\*\*  $< 0.0001$ .

## 6. RESULTADOS

Con el propósito de obtener títulos virales utilizables para los experimentos de este proyecto se realizaron técnicas de cultivo celular para la amplificación y purificación de los virus referencia DENV-1 WP y ZIKV- PR y los aislados clínicos DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax. 2016. En la **Figura VI** se muestra una imagen representativa de la morfología de las placas generadas por los virus utilizados en este estudio; virus referencia DENV-1 WP (A) y ZIKV PR (B) y los virus aislados de muestras clínicas DENV-1 Oax.2016 (C) y ZIKV Oax.2016 (D).

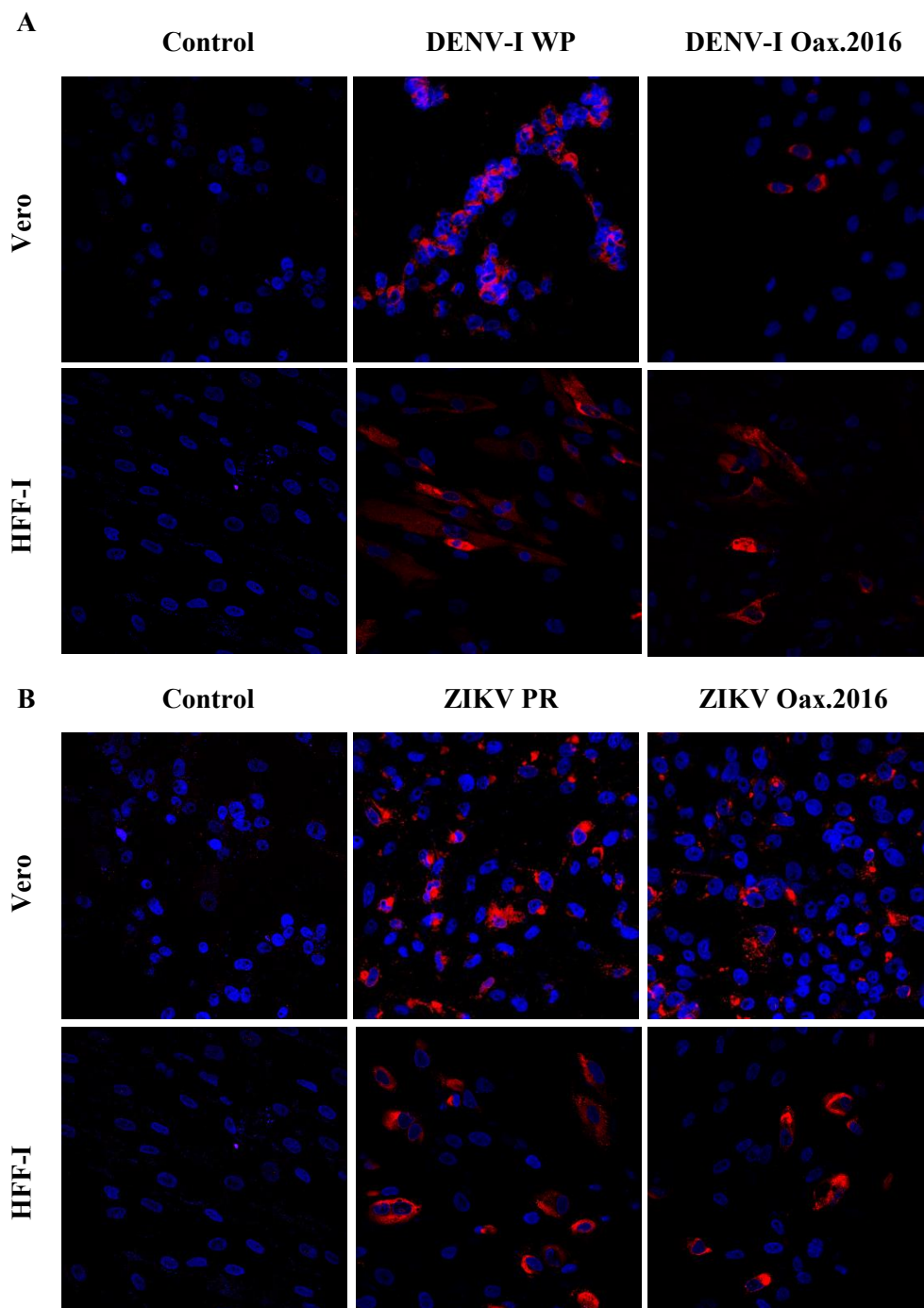


**Figura VI. Morfología de las placas generadas por virus referencia y aislados clínicos.** DENV-1 WP (A) y ZIKV PR (B) DENV-1 Oax.2016 (C) y ZIKV Oax.2016 (D).

*Caracterización del fenotipo evasor de la respuesta de IFNs-I de los aislados clínicos de DENV y ZIKV circulantes en el estado de Oaxaca.*

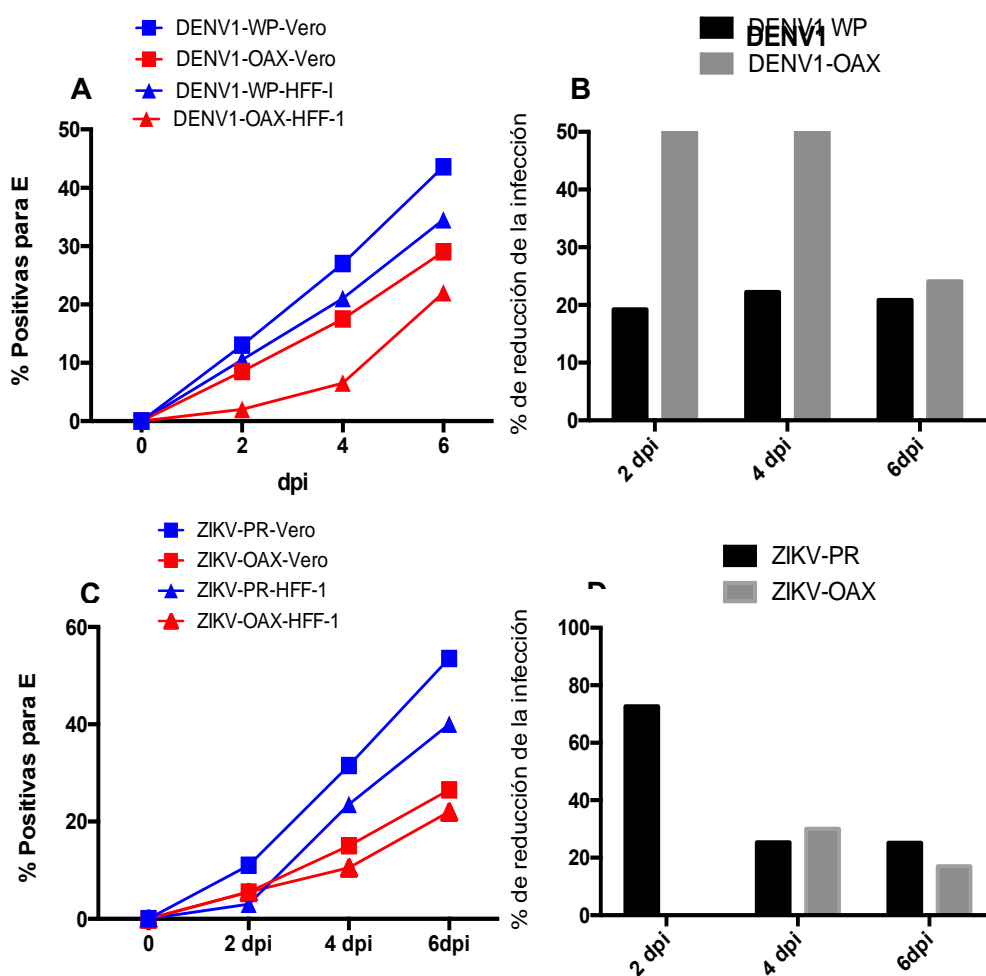
Se evaluó de forma cualitativa el fenotipo evasor de IFN-I mediante un análisis de microscopía confocal, en la **Figura VII** se muestra una imagen representativa en la cual células Vero fueron infectadas con DENV-1 WP y DENV-1 Oax.2016 (A), ZIKV PR y ZIKV Oax.2016 (B) a una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés) de 1 y fijadas 48 horas post-infección, se usó inmunofluorescencia indirecta intracelular para detectar la proteína de envoltura (rojo) y se contrastó el núcleo con DAPI (azul). Para ambos casos se observó que los virus aislados de las muestras clínicas (DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016) tienen la misma capacidad infectar tanto células Vero como

HFF en comparación con los virus referencia (DENV-1 WP y ZIKV PR), pues en todos los casos la proteína E fue evidenciada por inmunofluorescencia indirecta.



**Figura VII. Análisis por microscopía confocal del fenotipo evasor de IFN-I de DEN-1 y ZIKV.** Células Vero fueron infectadas con DENV-1 WP y DENV-1 Oax.2016 (A), ZIKV PR y ZIKV Oax.2016 (B) fueron infectadas MOI = 1 y fijadas 48 horas post-infección, se usó inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína de envoltura (rojo) y se contrastó con DAPI el núcleo (azul).

Con los datos obtenidos por microscopia confocal se realizó una evaluación semicuantitativa, en la cual se cuantificó el porcentaje de células positivas para la proteína de envoltura en células HFF-I conocidas por la alta producción de IFNs-I endógenos durante una infección viral, con respecto a células Vero que no producen IFNs-I. Dichas células fueron infectadas con muestras clínicas (DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016) y virus referencia (DENV-1 WP y ZIKV PR), el porcentaje de reducción de la infección se calculó considerando el porcentaje de infección en células Vero como el máximo al cual se le restó el porcentaje de infección en células HFF-I. Los resultados de la comparación entre aislado y virus referencia correspondientes (DENV WP con respecto a DENV OAX y ZIKV PR con respecto a ZIKV OAX) se muestran en la **Figura VIII**.



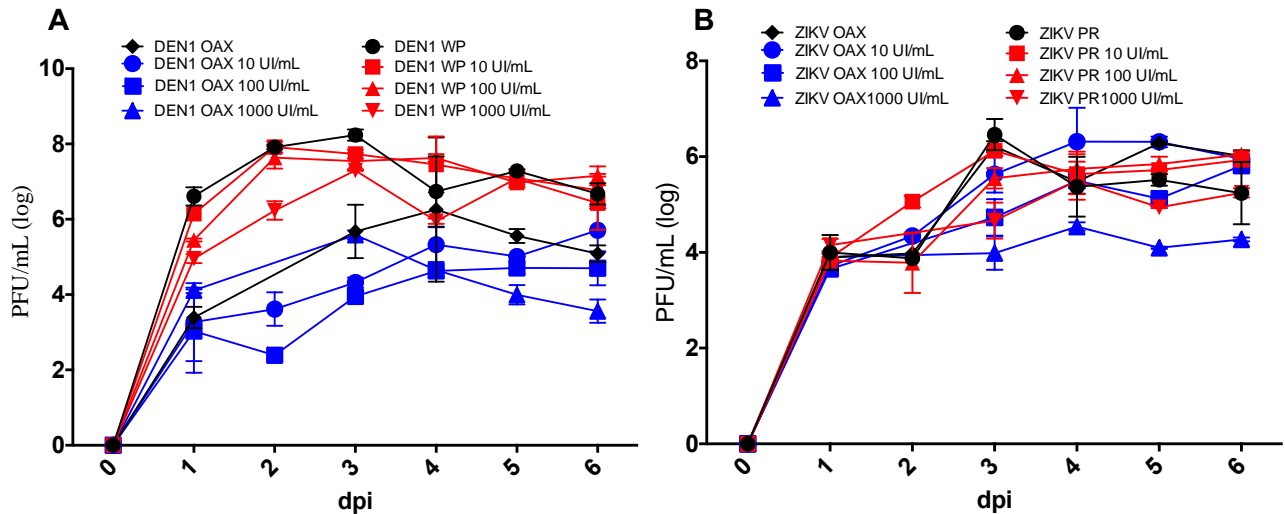
**Figura VIII. Análisis semicuantitativo del fenotipo evasor de IFN-I entre virus referencia y aislados clínicos.** Células Vero y células HFF-I fueron infectadas con DENV-1 WP, ZIKV PR, DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016 a MOI = 1 y fijadas 48 horas post-infección. Los datos fueron analizados por prueba *t* no paramétrica de Mann-Whitney.

En las infecciones con los aislados clínicos DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016, se observó una ligera disminución en el porcentaje de células positivas para la proteína de envoltura en células HFF-I con respecto a los virus referencia DENV-1 WP y ZIKV PR, respectivamente, no así en células Vero (**Figura VIII. A y C**). Los datos fueron analizados por prueba *t* no paramétrica de Mann-Whitney (**Figura VIII. B y D**) donde se presentó el porcentaje de reducción de la infección con respecto a los días pos-infección. Es evidente que DENV-1 Oax.2016 presenta mayor porcentaje de reducción de la infección en células HFF-I en comparación con DENV-1 WP mientras que ZIKV Oax.2016 pudo infectar en proporciones similares a ZIKV PR en células HFF-I. Aunque no se observaron diferencias significativas, los datos sugieren que DENV-1 Oax.2016 es poco eficiente evadiendo IFNs-I en comparación con el virus referencia DENV-1 WP, mientras que ZIKV Oax.2016 es mejor evasor que DENV-1 Oax.2016, sin embargo, no llega al nivel de evasión alcanzado por el virus referencia ZIKV PR.

Para evaluar de forma cuantitativa y considerar el ciclo replicativo completo de los virus se realizó una curva de sensibilidad a IFN- $\alpha$  recombinante. Células Vero fueron pre-tratadas por 16 horas con concentraciones crecientes de IFN- $\alpha$  recombinante a 10, 100 y 1000 UI/mL, posteriormente se infectaron a la misma multiplicidad de infección (0.1 MOI) con los aislados DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016 frente a virus referencia, se recolectaron sobrenadantes cada 24 hrs por 6dpi y se cuantificaron las PFUs por inmunocitoquímica (**Figura IX**).

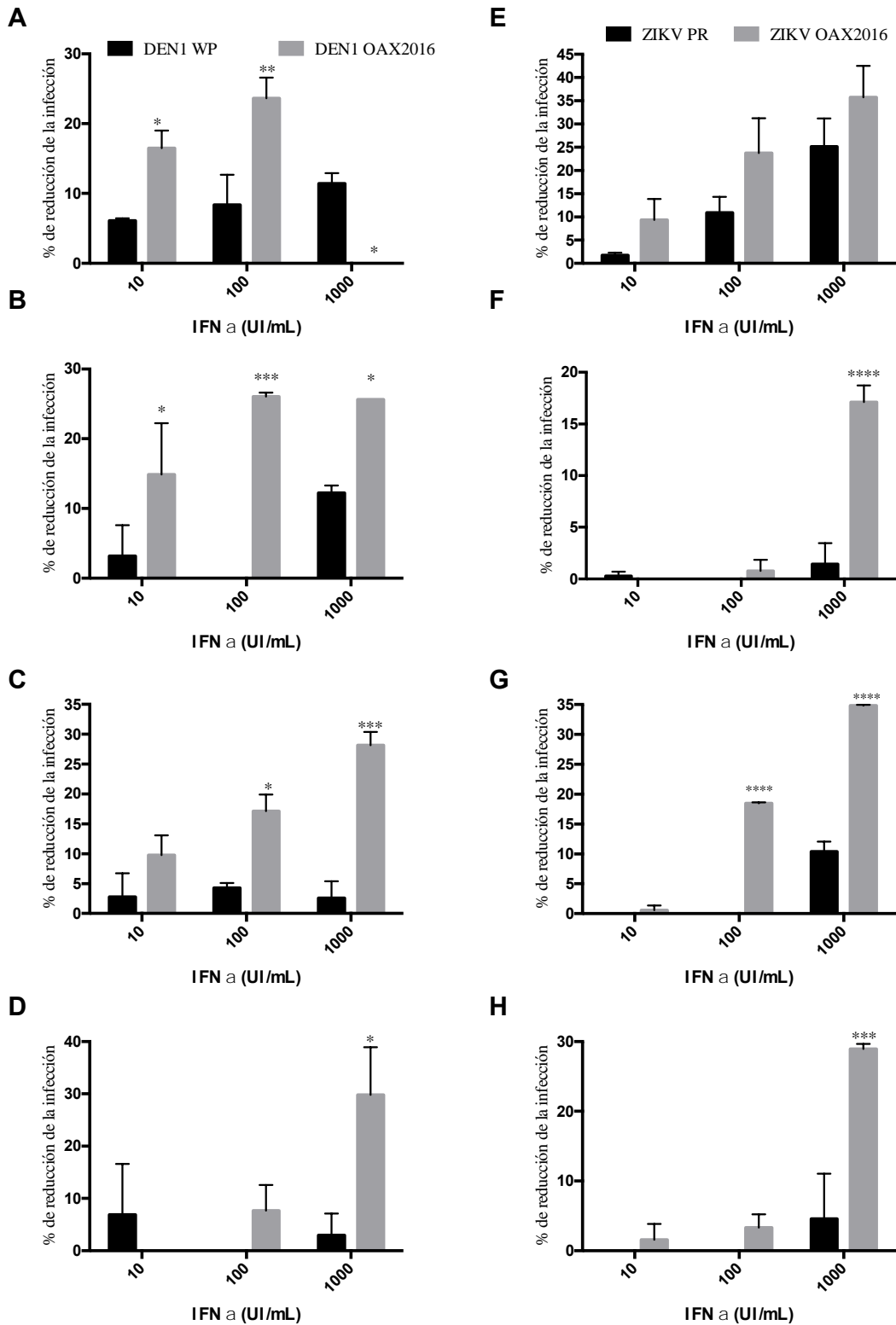
En la **Figura IX** se muestran los títulos virales de los sobrenadantes de las células infectadas en cada una de las condiciones anteriormente mencionadas expresadas en PFUs/mL en escala logarítmica con respecto a los días pos-infección. Los resultados se compararon por prueba de ANOVA de dos factores y múltiples comparaciones, los resultados obtenidos se expresan en porcentaje de reducción de la infección tomando como 100% el título viral en ausencia de IFN- $\alpha$  recombinante. En la **Figura IX** las gráficas **A, B, C y D** representan los días 3, 4, 5 y 6 días post-infección de DENV-1 WP y DENV-1 Oax.2016. La susceptibilidad al tratamiento con IFN- $\alpha$  es evidente para el aislado de DENV-1 Oax.2016 a partir del tercer día (**Figura X. A**) y desde los tratamientos de 10 y 100 UI/mL con diferencias significativas, dosis dependientes

excepto en 1000 UI/mL, así mismo al día 4, 5 y 6 (**Figura X. B, C y D** respectivamente) se observa que hay mayor porcentaje de reducción para el aislado clínico DENV-1 Oax.2016 y es estadísticamente significativo tanto en 10, 100 y 1000 UI/mL



**Figura IX. Curva de sensibilidad a IFN- $\alpha$ .** Células Vero, pre-tratadas por 16 hrs. con concentraciones crecientes de IFN $\alpha$  recombinante (10, 100 y 1000 UI/mL), posteriormente se infectaron a 0.1 MOI con virus referencia y aislados clínicos, se recolectaron sobrenada sobrenadantes cada 24 hrs. y se cuantificaron las PFUs.

Este comportamiento no se observa para los virus ZIKV PR y ZIKV Oax.2016 en etapas tempranas de la replicación (**Figura X. E**), ya que no hay diferencia significativa en el porcentaje de reducción de la infección entre estos virus. Sin embargo, para el día 4, se observa que el aislado ZIKV Oax.2016 pierde la capacidad de evasión en la concentración más alta de IFN- $\alpha$  (**Figura X. F**), y para el día 5 y 6 pos-infección la diferencia en el porcentaje de reducción de la infección es aún más evidente (**Figura X. G y H**). En conjunto los resultados sugieren que el aislado ZIKV Oax.2016 parece presentar un fenotipo evasor de la respuesta de IFNs-I superior al aislado DENV1 Oax.2016 pero inferior al virus referencia ZIKV PR, el cual se ha demostrado es un muy buen evasor de los IFNs-I (Grant *et al.*, 2016).



**Figura X. Actividad antiviral mediada por IFN- $\alpha$ .** Células Vero, pre-tratadas por 16 hrs. con IFN- $\alpha$  recombinante (10, 100 y 1000 UI/mL), e infectadas a 0.1 MOI con virus referencia y aislados clínicos por 24 hrs., se recolectaron sobrenada sobrenadantes cada 24 hrs. y se cuantificaron las PFUs. Los resultados se compararon por prueba de Anova de dos factores y múltiples comparaciones, los cuales se expresan en porcentaje de reducción de la infección tomando como 100% el título viral en ausencia de IFN- $\alpha$ . Se requirió  $\alpha$  de  $P < 0.5$  con intervalo de confianza de 95% en donde \*  $< 0.05$ , \*\*  $< 0.005$ , \*\*\*  $< 0.0005$  y \*\*\*\*  $< 0.0001$ .



## 7. DISCUSIÓN

Se sabe que los IFNs-I son las citocinas antivirales del sistema inmunitario innato por excelencia, ya que todas las células nucleadas son capaces producirla en respuesta a infecciones virales (Nan *et al.* 2017). En el presente trabajo se utilizó un modelo celular para evaluar el fenotipo evasor de IFNs-I con fibroblastos dérmicos debido a su conocida capacidad de producción de IFNs-I, particularmente  $\beta$  así como células Vero deficientes en la producción de IFNs-I. En este modelo celular se observó que DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016 tienen la misma capacidad infectar tanto células Vero como HFF-I en comparación con DENV-1 WP y ZIKV PR (**Figura VII. A y B**).

Es claro que en ausencia de IFNs-I endógenos (células Vero), los aislados DENV-1 Oax.2016 y ZIKV Oax.2016 son capaces de establecer infección productiva, mientras que la infección en células con alta producción de esta citocina (HFF-I), la replicación es menos eficiente en ambos casos (**Figura VIII. A y C**). Las diferencias en el porcentaje de reducción de la infección en el modelo semicuantitativo no son estadísticamente significativas (**Figura VIII. B y D**), sin embargo, se observa que el porcentaje de reducción de la infección del aislado DENV1 Oax.2016 tiende a ser mayor en comparación al virus referencia DENV1 WP, mientras que la tendencia en las diferencias en el porcentaje de reducción de la infección entre el aislado ZIKV Oax.2016 y el virus referencia ZIKV PR, parece ser menor. Es posible que, al no poder controlar la cantidad de IFNs-I endógenos secretados por las células HFF-I, el modelo semicuantitativo no cuente con una resolución suficiente para evidenciar diferencias sutiles en el fenotipo de evasión de los IFNs-I. Por lo que proponemos el modelo celular semicuantitativo, por su practicidad y rapidez, como técnica inicial de evaluación de fenotipo de evasión de IFNs-I de aislados con la reserva de la necesidad de confirmar dichos fenotipos por una técnica cuantitativa.

Considerando que para evaluar el fenotipo de evasión de IFNs-I en el modelo semicuantitativo se utilizó inmunofluorescencia intracelular dirigida únicamente a la proteína de envoltura, la cual puede encontrarse de manera libre en la célula hospedera y no necesariamente como parte del virión, decidimos evaluar la susceptibilidad a IFNs-I por una estrategia experimental que contemplara el ciclo replicativo completo

cuantificando la progenie viral en el sobrenadante de las células infectadas y realizando curvas de sensibilidad a IFN- $\alpha$  recombinante en células Vero, incapaces de producir IFNs-I endógenos, pero responsivas a dichas citocinas ya que cuentan con el receptor común IFNAR. En la comparación general de las curvas de sensibilidad de DENV-I WP y DENV-I Oax.2016 podemos observar mayor dispersión, es decir, diferencias mayores en los títulos, incluso hasta 1000 UI/mL. Lo que sugiere diferencias mayores en la susceptibilidad a IFNs-I. **(Figura IX. A)**

Esto no ocurre en las gráficas de sensibilidad a IFNs-I para ZIKV PR y ZIKV Oax.2016 cuya dispersión es similar, lo que sugiere diferencias menores entre ambos virus tienen semejante capacidad de evasión de la respuesta a IFNs-I **(Figura IX. B)**.

Cuando analizamos los datos por día post-infección y porcentaje de reducción de la infección, es evidente que la evaluación cuantitativa del fenotipo de evasión de IFNs-I proporciona más resolución, particularmente de la capacidad de mantener inhibida la respuesta de IFNs-I. Tal es el caso para DENV-1 Oax.2016, que demostró ser más susceptible al tratamiento con IFN- $\alpha$  ya que para todos los días post-infección evaluados y bajo las tres concentraciones de IFN $\alpha$  el porcentaje de reducción de la infección fue estadísticamente menor en comparación con el de DENV-1 WP **(Figura X. A, B, C y D)**

Este comportamiento no se replica para los virus ZIKV PR y ZIKV Oax.2016 en etapas tempranas de la replicación **(Figura X. E)**, pues no hay diferencia significativa del porcentaje de reducción de la infección entre estos virus lo que nos sugiere que los dos son muy similares en su capacidad de evadir los IFNs-I. Sin embargo, para el día 4 **(Figura X. F)**, se observa que el aislado ZIKV Oax.2016, pierde la capacidad de evasión en la concentración más alta de IFN $\alpha$ . Para los días 5 y 6 post-infección, el porcentaje de inhibición de la replicación del aislado ZIKV.OAX.2016 incrementa **(Figura X. G y H)**. Estos resultados confirman el fenotipo evasor de ZIKV PR reportado por Grant y colaboradores (Grant *et al.*, 2016). Una posible explicación de estas diferencias en el fenotipo evasor entre aislados podría ser la estequiométrica, donde los elementos moleculares responsables de la evasión no se generen a la concentración óptima en comparación con el ZIKV PR de referencia, por lo que no son suficientes para mantener inhibida la actividad por periodos prolongados, mientras que el virus referencia está mejor

adaptado a la presencia de IFN $\alpha$ . Nuestros resultados del fenotipo de evasión de la respuesta de interferones de tipo I del virus referencia ZIKV PR confirman el reporte de Grant y colaboradores, donde demostraron que la proteína viral NS5 de aislados de ZIKV epidémicos (como ZIKV PR) inhibe la activación de STAT2, impidiendo la transcripción de los ISGs en respuesta a la infección, por lo que es capaz de mantener bloqueada la respuesta antiviral en la etapa de inducción en fases tardías (Grant *et al.*, 2016). Es posible que el bloqueo de la NS5 del aislado ZIKV Oax.2016, sea parcial o inexistente. Se requieren más experimentos para determinar mecanismo de inhibición entre estos dos ZIKV epidémicos.

La muestra clínica de la cual se aisló el virus ZIKV Oax.2016 proviene de un paciente que, durante la fase crítica de la enfermedad, no presentó fiebre ni conjuntivitis, pero sí sarpullido sin comezón y fue diagnosticado clínicamente con enfermedad viral por Zika y en una segunda opinión por Chikungunya. Es probable que el fenotipo de evasión de IFNs-I en las etapas iniciales por este aislado estén relacionadas con la presencia de sintomatología, pero al ser incapaz de mantener la inhibición de la respuesta de IFNs-I por periodos prolongados, el virus fue más fácil de controlar impidiendo que el cuadro clínico se complicara. Cabe destacar el acierto del diagnóstico clínico inicial, debido a que los brotes de infecciones por *Flavivirus* ocurren en regiones con escasos recursos económicos, es poco viable el diagnóstico molecular. La correcta identificación de las manifestaciones clínicas por los trabajadores de la salud de primer contacto es vital para el manejo y contención de los brotes. En nuestro laboratorio, se tomaron un gran número de muestras sanguíneas de pacientes en etapa febril con sintomatología característica de infección por arbovirus durante los brotes de 2016 y 2017 en el estado de Yucatán, con este modelo cualitativo y cuantitativo fue posible evaluar el fenotipo de un aislado de 2016, por lo que se utilizará el modelo celular semicuantitativo para evaluar el fenotipo de evasión de IFNs-I y en los aislados el cual será confirmado por la estrategia cuantitativa. Con este modelo se puede evaluar de manera confiable el fenotipo de evasión de la respuesta de IFNs-I de aislados circulantes de *Flavivirus* durante los brotes, lo que permitirá la identificación y comparación de variantes mejor adaptadas a la respuesta inmunológica innata en la población mexicana, así como identificar el riesgo potencial de brotes con mayor número de casos severos.

El presente trabajo pretende realizar una aportación al estudio de la epidemiología y variabilidad de la respuesta inmunológica innata en la población mexicana, los productos generados permitirán la consolidación del protocolo de evaluación del fenotipo de evasión de la respuesta de IFNs-I, así como la generación de un banco de aislados flavivirales mexicanos caracterizados a nivel de virulencia, ubicación geográfica y cuadro clínico asociado. El banco de aislados flavivirales mexicanos de la UBIMED de la FES Iztacala, permitirá la colaboración con diversos grupos de investigación, incrementando el conocimiento de estos *Flavivirus* y su impacto en la salud pública mexicana.

## 8. CONCLUSIONES

Se desarrolló una técnica experimental para evaluar la susceptibilidad a IFNs-I mediante un modelo celular, sin embargo, la evaluación cualitativa del fenotipo evasor de IFNs-I no proporciona la suficiente resolución para evidenciar diferencias sutiles en el fenotipo de evasión de IFNs-I. Para ello se desarrolló una técnica experimental para cuantificar diferencias sutiles en la susceptibilidad de IFNs-I entre aislados de *Flavivirus* y se validó con un aislada referencia, cuya capacidad para evadir la señalización de IFNs-I ha sido reportada con anterioridad (ZIKV-PR).

Los aislados de DENV y ZIKV circulantes en el estado de Oaxaca durante el periodo de lluvias 2016, presentaron diferente fenotipo de evasión de la respuesta de IFNs-I en comparación con virus adaptados al laboratorio y entre sí.

El aislado mexicano ZIKV-Oax.2016 tiene un comportamiento similar a ZIKV-PR evadiendo la respuesta de IFN-I en las etapas iniciales a la infección, mientras que el aislado DENV-Oax.2016 presentó mayor susceptibilidad en el tratamiento con respecto al virus referencia utilizado (DENV-I WP).

Se comprobó que esta estrategia experimental es escalable para el estudio de otros aislados durante brotes anuales.

En México, la vigilancia epidemiológica de *Flavivirus* se limita a la identificación, tipificación y, en algunos casos, secuenciación del genoma viral. Sin embargo, dichos virus son altamente variables y adaptables a presiones evolutivas como la respuesta inmunológica del hospedero primate como en el mosquito, dichas presiones evolutivas no son equivalentes en las diferentes regiones endémicas del mundo, prueba de ello es la circulación de diferentes serotipos predominantes del virus dengue en países de Latinoamérica durante los mismos años (Dantés *et al.*, 2014).

Por lo que el presente proyecto propone la evaluación del fenotipo evasor de IFNs-I como medida práctica y cuantificable de la virulencia de *Flavivirus* seleccionados en regiones endémicas de México.

## 9. PERSPECTIVAS

Aplicar la metodología desarrollada en este proyecto al banco de aislados mexicanos con la finalidad de comprender la relación entre la selección de variantes con mayor adaptabilidad epidemiológica dependiente de la evasión de la respuesta de IFNs-I entre los mismos y la severidad de las manifestaciones clínicas.

Correlacionar la selección de variantes genéticas de *Flavivirus* con la distribución cíclica de los cuatro serotipos de DENV en nuestro país y evaluar si existen desplazamientos intra-serotipo.

Comprender el mecanismo de acumulación de sfRNA en aislados de *Flavivirus* mexicanos y su relación con la evasión de la respuesta de IFNs-I.

## 10. REFERENCIAS

- Acosta-Bas, C., & Gómez-Cordero, I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *REVISTA BIOMÉDICA*, 16(2), 113-138. Recuperado de <http://revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/408/419>
- Attaway D.F., Waters N.M., Geraghty E.M., Jacobsen K.H. 2017. Zika virus: Endemic and epidemic ranges of Aedes mosquito transmission *Journal of Infection and Public Health*, 10 (1), pp. 120-123.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V. & Penin, F. 2013. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 482–496 doi:10.1038/nrmicro.2017.170
- Bell TM, Field EJ, Narang HK (1971) Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch Gesamte Virusforsch* 35(2):183–193
- Bhatt, S., P. Gething, O. Brady, J. Messina, A. Farlow, C. Moyes, J. Drake, J. Brownstein, A. Hoen, O. Sankoh, M. Myers, D. George, T. Jaenisch, G. Wint, C. Simmons, T. Scott, J. Farrar & S. Hay. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: (7446), 504-507. <http://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bidet K, Dadlani D, Garcia-Blanco MA (2014) G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 Are Required for Translation of Interferon Stimulated mRNAs and Are Targeted by a Dengue Virus Non-coding RNA. *PLOS Pathogens* 10(7): e1004242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004242>
- Bustos-Arriaga, J., García-Machorro, J., León-Juárez, M., García-Cordero, J., Santos-Argumedo, L., Flores-Romo, L. Cedillo-Barrón, L. 2011. Activation of the Innate Immune Response against DENV in Normal Non-Transformed Human Fibroblasts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5:12.
- Bowie A.G. y Unterholzner, L. 2008. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling *Nature Reviews Immunology*.8:911-922
- Brand, C., Bisailon, M. and Geiss, B. J. (2017), Organization of the *Flavivirus* RNA replicase complex. *WIREs RNA*, 8: n/a, e1437. doi:10.1002/wrna.1437

- Briant L, Desprès P, Choumet V, Missé D. 2014. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology* 464–465:26–32 By Leah C. Katzelnick, Lionel Gresh, M. Elizabeth Halloran, Juan Carlos Mercado, Guillermina Kuan, Aubree Gordon, Angel Balmaseda, Eva Harris. 2017. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *SCIENCE*. 929-932
- Cáceres, O. 2003. Detección rápida de los serotipos del virus dengue en el mosquito *Aedes aegypti*. *Revista peruana medicina experimental y salud pública.* , 20(3), 156-158. Recuperado en 12 de enero de 2018, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-463420030003000008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-463420030003000008&lng=es&tlng=es)
- Calvet G, Aguiar RS, Melo A, Sampaio SA. 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet infectious diseases*. Volume 16, Issue 6, 653 – 660 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
- Cao-Lormeau, V. M. 2016. Brote de Síndrome de Guillain-Barré asociado con la infección por el virus Zika en la Polinesia Francesa: Un estudio de casos y controles, *Lancet* 387 (10027):1531-1539 pp.
- Capobianchi, M.R. E. Uleri, C. Caglioti, A. Dolei. 2015. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 26 pp. 103111, [10.1016/j.cytogfr.2014.10.011](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.10.011)
- Cedillo-Barrón, L., García-Cordero, J., Bustos-Arriaga, J. Leon-Juarez M. Gutierrez-Castañeda, B. 2014. Antibody response to dengue virus. *Microbes and infection*. 9(16): 711-120 pp.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Clinical Description For Case Definitions recuperado el 30 septiembre de 2016 en <http://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/casedef.html>.
- Cheol L., Hyun Ah Yi y Chan Hee Lee. 2016. Stimulation of interferon- gene expression by human cytomegalovirus via nuclear factor kappa B and phosphatidylinositol 3-kinase



pathway. *Virus Research* 117 (2006) 209–214.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.08.018>

- Chew T, Noyce R, Collins SE, Hancock MH, Mossman KL. 2009. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol*, 2009. 46(3): p. 393-9.
- Dalrymple, N. A., Cimica, V., & Mackow, E. R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio*, 6(3), e00553–15. <http://doi.org/10.1128/mBio.00553-15>
- Dantés HG, Farfán-Ale JA, Sarti E. 2014. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Mexico (2000–2011): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(11): e3158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003158>
- Dick, G.W., Kitchen, S. F. y Haddow, A. J. 1952. Zika virus. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46: 509–520 pp.
- Donald CL, Brennan B, Cumberworth SL, Rezelj VV, Clark JJ, et al. (2016) Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(10): e0005048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005048>
- Egloff, M.P.; Benarroch, D.; Selisko, B.; Romette, J.L.; Canard, B. 2002. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the *Flavivirus* RNA polymerase NS5: Crystal structure and functional characterization. *EMBO J.*, 21, 2757–2768.
- Fan, J.; Liu, Y.; Yuan, Z. 2014. Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. *Virology*, 29(3):162-9. doi: 10.1007/s12250-014-3459-1.
- Flipse, J., Diosa-Toro, M. A., Hoornweg, T. E., van de Pol, D. P. I., Urcuqui-Inchima, S., & Smit, J. M. (2016). Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. *Scientific Reports*, 6, 29201. <http://doi.org/10.1038/srep29201>

- Fontes CA, Dos Santos AA, Marchiori E (2016) Magnetic resonance imaging findings in Guillain-Barré syndrome caused by Zika virus infection. *Neuroradiology* 58(8):837–838. doi:10.1007/s00234-016-1687-9
- Guzmán, María G., Gubler, D. J., Izquierdo A., Martinez, E. y Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*. *Nat. Rev. Dis. Primers* doi:10.1038/nrdp.2016.55
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., ... García-Sastre, A. (2016). Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 882–890. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Donald CL, Brennan B, Cumberworth SL, Rezelj VV, Clark JJ, et al. (2016) Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(10): e0005048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005048>
- Guzmán, M. G., García G.y Kourt. G. 2008. Dengue y fiebre hemorrágica del dengue, un problema de salud mundial. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 60 (1):5-16pp Recuperado en 12 de enero de 2018, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602008000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000100001&lng=es&tlng=es)
- Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R., & Lee, C. 2014. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 3(1), 58–77. <http://doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.58>
- Gao D, Lou Y, He D, Porco TC, Kuang Y, Chowell G, Ruan S (2016) Prevention and control of Zika as a mosquito-borne and sexually transmitted disease: a mathematical modeling analysis. *Sci Report* 6. doi:10.1038/srep28070
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F., Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Desprès P, Amara A, Yssel H, Missé D (2015) *Biología de la infección por el virus*

- Zika en células de la piel humana. *J Virol* 89 (17): 8880 - 8896. doi: 10.1128 / JVI.00354-15
- Hayes EB (2009 Sep) (2009) Virus Zika fuera de África. *Emerg Infect Dis* 15 (9): 1347 - 1350. doi: 10.3201eid1509.090442
  - Hertzog, J., Dias Junior, A. G., Rigby, R. E., Donald, C. L., Mayer, A., Sezgin, E., ... Rehwinkel, J. (2018). Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *European Journal of Immunology*, 48(7), 1120–1136. <http://doi.org/10.1002/eji.201847483>
  - Laurin. Roetzer, Thomas Huber, Andreas Sailer, Anne Oberson, Marina Treinies, Simon Heidegger, Tina Herbst, Stefan Endres, Carole Bourquin. 2015. TLR and RLR Signaling Are Reprogrammed in Opposite Directions after Detection of Viral Infection. *The Journal of Immunology*. 195 (9) 4387-4395; DOI: 10.4049/jimmunol.1500079
  - Ivashkiv L. B. y Laura T. Donlin. 2013. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology* volume14, pages36–49. doi:10.1038/nri3581
  - Jindadamrongwech, S.C. Thepparit, DR Smith. 2014. Identification of GRP 78 (BiP) as liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arco Virol*. 149 (5): 15-27
  - Kaukinen, P., Sillanpää, M., Nousiainen, L., Melén, K. and Julkunen, I. (2013), Hepatitis C virus NS2 protease inhibits host cell antiviral response by inhibiting IKK $\epsilon$  and TBK1 functions. *J. Med. Virol.*, 85: 71-82. doi:10.1002/jmv.23442
  - Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. 1998. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 72:73–83.
  - Kurosu, T. (2011). Quasispecies of dengue virus. *Tropical Medicine and Health*, 39(4 Suppl), 29–36. <http://doi.org/10.2149/tmh.2011-S02>
  - Lauring AS, Andino R (2010) Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathog* 6(7): e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>

- León-Juárez, M., J. García-Cordero, L. Santos-Argumedo, H. Romero-Ramírez, J. García-Machorro, J. Bustos-Arriaga, B. Gutiérrez-Castañeda, N. Sepúlveda, G. Mellado-Sánchez, G. y L. Cedillo-Barrón. 2013. Generation and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the envelope protein from the four dengue virus serotypes. *APMIS*, 121(9), 848-858 pp.
- Lu, G. y Gong, P. 2017 . A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus. *Virus Research*, 234, 34–43. doi:10.1016/j.virusres.2017.01.020
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E. Z., ... Ooi, E. E. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6257), 217–221. <http://doi.org/10.1126/science.aab3369>
- Megías, M., Molist, P, y Pombal, M. A. 2016. Técnicas histológicas. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. 24p.
- Moon, S. L., Anderson, J. R., Kumagai, Y., Wilusz, C. J., Akira, S., Khromykh, A. A., & Wilusz, J. 2012. A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *RNA*, 18(11), 2029–2040. <http://doi.org/10.1261/rna.034330.112>
- Midgley CM, Bajwa-Joseph M, Vasanawathana S. 2011. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *J Virol*.85:410-21 pp.
- Moureau G, Cook S, Lemey P, Nougairede A, Forrester NL, et al. (2015) New Insights into *Flavivirus* Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences. *PLOS ONE* 10(2): e0117849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117849>
- Nan, Y., Wu, C., y Zhang, Y.-J. (2017). Interacción entre Janus Kinase / Transductor de señal y Activador de señalización de transcripción activada por interferones tipo I y antagonismo viral. *Frontiers in Immunology* , 8 , 1758. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01758>

- Nasirudeen, A. M. A., Wong, H. H., Thien, P., Xu, S., Lam, K.-P., & Liu, D. X. (2011). RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1), e926. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000926>
- Priyamvada L., Quicke K. M., Hudson W.H., Onlamoon N., Sewatanon J., Edupuganti S., Pattanapanyasat K., Chokephaibulkit K., Mulligan M.J., Wilson P.C., Suthar R. A. y Wrammert J. 2016. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *PNAS*. 113 (28): 7852-7857 pp.
- Quach, H., & Quintana-Murci, L. (2017). Living in an adaptive world: Genomic dissection of the genus *Homo* and its immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(4), 877–894. <http://doi.org/10.1084/jem.20161942>
- Romero-Cabello, R. 2008. *Microbiología y parasitología humana*. Buenos Aires Editorial Salazar, Médica Panamericana. 485 pp.
- Salazar, M.I., del Angel, R. M., Lanz-Mendoza, H., Ludert, J.E. y Pando-Robles, V. 2014. The role of cell proteins in dengue virus infection. *Journal of Proteomics*. 111: 6–15
- Rodriguez, K. R., Bruns, A. M., & Horvath, C. M. 2014. MDA5 and LGP2: Accomplices and Antagonists of Antiviral Signal Transduction. *Journal of Virology*, 88(15), 8194–8200. <http://doi.org/10.1128/JVI.00640-14>
- Rodriguez-Madoz, J.R.; Belicha-Villanueva, A.; Bernal-Rubio, D.; Ashour, J.; Ayllon, J.; Fernandez-Sesma, A. 2010. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. *J. Virology* 84, 9760–9774.
- Rodriguez-Madoz, J.R.; Bernal-Rubio, D.; Kaminski, D.; Boyd, K.; Fernandez-Sesma, A. 2010. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *J. Virology*. 84, 4845–4850.

- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*, 32, 513–545. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Secretaria de salud, Subsecretaria de prevencion y promoción de la salud y Dirección general de epidemiología. 2017. Panorama Epidemiológico de Dengue, 2016. [En línea]. Consultado el 30 de Enero de 2017. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS\\_2016/Pan\\_o\\_dengue\\_sem\\_52\\_2016.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2016/Pan_o_dengue_sem_52_2016.pdf)
- Shashank S. P., S. Dhar, S. Tiwari, C. R. Ojha, J. Lapierre, K. Martins, A. Rodzinski, T. Parira, I. Paudel, J. Li, R. K. Dutta, M. R. Silva, A. Kaushik, N. El-Hage. 2017. Overview on the Current Status of Zika Virus Pathogenesis and Animal Related Research. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 12 (3): 371–388.
- Sirohi, D., Z. Chen, L. Sun, T. Klose, T. C. Pierson, M. G. Rossmann, y R. J. Kuhn. 2016. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* 352 (6284), 467-470. <http://doi.org/10.1126/science.aaf5316>
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., ... Gale, M. (2005). Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *Journal of Virology*, 79 (5), 2689-2699.
- Suthar, M. S., Diamond, M.S. y Gale, M. 2013. West Nile virus infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology* 11, 115-128 pp.
- Suzuki, Y., Chin, W.-X., Han, Q., Ichiyama, K., Lee, C. H., Eyo, Z. W., ... Yamamoto, N. (2016). Characterization of RyDEN (C19orf66) as an Interferon-Stimulated Cellular Inhibitor against Dengue Virus Replication. *PLoS Pathogens*, 12(1), e1005357. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005357>
- Thepparit, C. y D.R. Smith. 2004. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol*, 78:12647–1265

- Tibaire-Montes, M. 2001. Actualización en dengue- Parte 2. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 21(2), 78-84
- Tortora, G., Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. Médica Panamericana. Argentina. pp. 396.
- Vasilakis, N. y S. C. Weaver. 2017. *Flavivirus* transmission focusing on Zika. 7, 22:30–35
- Velandia, M.L. y J.E. Castellanos. 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Asociación Colombiana de infectología. 15(1):33-43.
- Villamarin, H. E. Y. 2016. Determinación por microELISA de anticuerpos IgM contra el virus del dengue, en donantes de sangre de la provincia del Guayas, en el hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, en el periodo Octubre- diciembre 2015. Tesis de Licenciatura. Universidad Central del Ecuador. 99 p.
- Weaver, S.C. y W. K. Reisen. 2009. Present and future arboviral threats. Antiviral Res. 85:328–345.
- Zou, J., Xie, X., Wang, Q. Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., Yuan, Z., ... Shi, P. Y. 2015. Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *Journal of virology*, 89(7), 3455-70.