



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOMEDICINA (UBIMED)

EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL RNA  
SUBGENÓMICO FLAVIVIRAL DE AISLADOS  
MEXICANOS DE VIRUS ZIKA

**TESIS**

Que para obtener el título de

**BIÓLOGO**

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

Valeria Martínez Torres

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. José Bustos Arriaga



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. 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.

DEDICATORIA

*Con amor a mi familia:  
mis papás José y Araceli y mi hermana Lilo*

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

El siguiente proyecto fue realizado gracias al apoyo financiero de PAPIIT, DGAPA, UNAM Proyectos: IA204119 y IA209017 y el Programa de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, CONACYT con el Proyecto PN2029.

El proyecto fue llevado a cabo en la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED) de la FES-Iztacala, en el laboratorio de Biología molecular e inmunología de arbovirus, dirigido por el Dr. José Bustos Arriaga a quien agradezco la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis, confiar en mí, compartir sus conocimientos y siempre estar en la mejor disposición de ayudar a los alumnos. Gracias por los consejos y siempre animarme.

A mis sinodales, Dr. Felipe Vaca Paniagua, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, Dr. José Luis Reyes Hernández y Q.F.B. Tannya Karen Castro Jiménez, por su apoyo, comprensión y observaciones.

Al Dr. Federico Ávila Moreno y Dra. Irlanda Peralta Arrieta por el apoyo en la realización experimental del proyecto, su tiempo, los consejos y el apoyo emocional.

A mis compañeros en el laboratorio quienes me apoyaron en la enseñanza y desarrollo del proyecto: Karen, María, Leonardo, Érick, Iliana, Jazmín y Marcos.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres, José y Araceli quienes me han apoyado durante toda mi trayectoria escolar y me han brindado lo mejor de ellos. Gracias por ser un ejemplo y enseñarme la dedicación, el esfuerzo, el compromiso y a buscar soluciones. Gracias por todo su amor y compañía en mi vida. Los amo.

A mi hermana Lilo que ha sido un ejemplo y mi mejor compañía en estos años. Gracias por tu apoyo incondicional, darme ánimos y consejos, por todas nuestras pláticas, la confianza y el amor.

A mis amigos en la FES, sobre todo Lupita, Adri, Iskra y Nata, por acompañarme estos 5 años y todas nuestras experiencias en la escuela, prácticas de campo y fuera. Gracias por las veces que me escucharon, apoyaron y todas las risas que compartimos. Éxito a todas, las quiero enormemente. Especialmente Lupita, porque no necesitamos tanto tiempo para formar lazos tan fuertes, por estar ahí siempre y escuchar todo lo que necesitara contar, enseñarme nuevas cosas y por brindarme tu confianza y amistad.

A los chicos que conocí en laboratorio y que compartí momentos geniales. Gracias María, Leo, Érick, Jazz y Marcos por hacerme reír tanto, que el trabajo fuera más llevadero y toda la buena vibra dentro y fuera de la FESI. Éxito a todos.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
MARCO TEÓRICO .....	2
Clasificación y vectores de Flavivirus.....	2
Estructura de la partícula flaviviral .....	3
Genoma flaviviral .....	5
Cap 5'.....	5
Marco abierto de lectura (ORF) .....	6
Regiones no traducidas (UTR).....	7
Ciclo replicativo.....	8
Reconocimiento y entrada .....	8
Desencapsidación.....	9
Traducción y replicación.....	9
Ensamblaje y maduración .....	10
Liberación .....	11
Respuesta celular antiviral.....	12
Activación por RLRs.....	12
Activación por TLRs .....	13
Interferones tipo 1 (IFNs-I).....	14
Evasión del sistema inmunológico innato por flavivirus .....	15
RNA subgenómico (sfRNA).....	16
Epidemiología de ZIKV .....	17
Generación de variantes genéticas.....	18
Fitness epidemiológico .....	18
ANTECEDENTES.....	19
JUSTIFICACIÓN .....	20
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVO GENERAL .....	21

METODOLOGÍA.....	22
Cultivo celular .....	22
Virus .....	22
Diseño de oligonucleótidos.....	22
Oligonucleótidos para sfRNA ZIKV .....	23
Oligonucleótidos para gRNA ZIKV .....	23
Oligonucleótidos para GAPDH .....	23
Infecciones con aislados virales .....	24
Seguimiento de la cinética de infección .....	24
Obtención de muestras virales .....	24
Titulación de sobrenadantes de la cinética de infección .....	25
Inmunocitoquímica de unidades formadoras de placa (PFUs) .....	25
Cálculo del título viral (PFU/mL) .....	25
Extracción de RNA.....	26
Síntesis de DNA complementario .....	26
Validación de la síntesis de cDNA mediante PCR punto final.....	27
Electroforesis .....	27
Cuantificación relativa mediante qPCR.....	27
Análisis de datos.....	28
Densitometría .....	28
RESULTADOS.....	29
Seguimiento de la cinética de infección .....	29
Validación de la amplificación de los oligonucleótidos diseñados.....	32
Amplificación de sfRNA y gRNA mediante qPCR .....	33
Densitometría de los amplicones obtenidos mediante qPCR .....	37
DISCUSIÓN .....	41
CONCLUSIONES.....	44
PERSPECTIVAS.....	45
LITERATURA CITADA.....	46

## ABREVIATURAS

<b>CARD</b>	Dominios de reclutamiento y activación de caspasas
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CLR</b>	Receptores de lecitina tipo C
<b>Ct</b>	Umbral de ciclo
<b>DB</b>	Dumbell
<b>DC-SIGN</b>	Molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas
<b>DENV</b>	Virus del dengue
<b>dNTP</b>	Deoxinucleótido trifosfato
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b>Fw</b>	Forward
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato
<b>gRNA</b>	RNA genómico
<b>HCV</b>	Virus de la hepatitis C
<b>HIV</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>IFNAR</b>	Receptor de interferón alfa
<b>IFNs-I</b>	Interferones de tipo I
<b>IRF</b>	Factor regulador de interferón
<b>iRNA</b>	RNA de interferencia
<b>ISG</b>	Gen estimulador de interferón
<b>JEV</b>	Virus de la encefalitis japonesa
<b>MAVS</b>	Proteína señalizadora antiviral mitocondrial
<b>MbFv</b>	Flavivirus transmitidos por mosquitos
<b>MDA-5</b>	Factor de diferenciación del melanoma tipo 5
<b>MEM</b>	Medio mínimo esencial de Eagle
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NC</b>	Nucleocápside

<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de cadenas kappa de células B
<b>NS</b>	Proteína no estructural
<b>NTC</b>	Control sin muestra
<b>NTPasa</b>	Nucleósido trifosfatasa
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PFU</b>	Unidades formadoras de placa
<b>prM</b>	Glicoproteína precursora de membrana
<b>PRR</b>	Receptor de reconocimiento de patrones
<b>qPCR</b>	PCR tiempo real/cuantitativa
<b>RdRp</b>	RNA polimerasa dependiente de RNA
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RIG-1</b>	Gen inducido por ácido retinoico 1
<b>RLR</b>	Receptor tipo RIG-1
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Retrotranscriptasa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa
<b>RU</b>	Unidades relativas
<b>Rv</b>	Reverse
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>sfRNA</b>	RNA subgenómico
<b>SL</b>	Stem-loop
<b>STING</b>	Estimulador de genes de IFN
<b>TAE</b>	Tris-ácido acético-EDTA
<b>TBK</b>	Cinasas de unión a TANK
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>TRAF</b>	Receptor de TNF-α asociado a factor
<b>ssRNA</b>	RNA de cadena sencilla
<b>UTR</b>	Región no traducida



<b>WNV</b>	Virus del Nilo occidental
<b>XRN1</b>	Exoribonucleasa 1
<b>xrRNA</b>	RNA resistente a exoribonucleasa
<b>YFV</b>	Virus de la fiebre amarilla
<b>ZIKV</b>	Virus del Zika

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético de algunos flavivirus transmitidos por mosquitos	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema de la partícula flaviviral madura	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Organización de la proteína E en la partícula flaviviral madura a pH neutro	<b>4</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema del genoma flaviviral y sus elementos cap 5', ORF, 5' y 3' UTR	<b>8</b>
<b>Figura 5.</b> Rearreglo de la envoltura flaviviral antes y después de su maduración	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b> Ciclo replicativo de flavivirus	<b>11</b>
<b>Figura 7.</b> Esquema de vías de señalización para inducir la producción de IFNs-I	<b>14</b>
<b>Figura 8.</b> Esquema de las regiones del genoma de ZIKV amplificadas con los oligonucleótidos diseñados	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b> Cinética de infección de los aislados virales en células C6/36	<b>30</b>
<b>Figura 10.</b> Morfología de placa de infecciones con sobrenadantes de células C6/36 infectadas a 0.1 MOI con los aislados virales	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Cinética de infección de los aislados virales en células U937	<b>31</b>
<b>Figura 12.</b> Morfología de placa de infecciones con sobrenadantes de células U937 infectadas a 0.1 MOI con los aislados virales	<b>32</b>
<b>Figura 13.</b> Amplificación de sfRNA, gRNA y GAPDH de cada aislado viral	<b>33</b>
<b>Figura 14.</b> Curvas de amplificación de sfRNA y gRNA en C6/36 infectadas con los aislados virales	<b>34</b>
<b>Figura 15.</b> Curvas de amplificación de sfRNA y gRNA en U937 infectados con los aislados virales	<b>35</b>
<b>Figura 16.</b> Normalización de los datos de Ct de C6/36 y U937	<b>36</b>

<b>Figura 17.</b> Comparación de la acumulación relativa de sfRNA de los aislados virales en C6/36 y U937 mediante el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$	<b>37</b>
<b>Figura 18.</b> Amplicones obtenidos mediante qPCR de infecciones en C6/36	<b>38</b>
<b>Figura 19.</b> Amplicones obtenidos mediante qPCR de infecciones en U937	<b>39</b>
<b>Figura 20.</b> Unidades relativas de sfRNA y gRNA en C6/36	<b>40</b>
<b>Figura 21.</b> Unidades relativas de sfRNA y gRNA en U937	<b>41</b>

## RESUMEN

El virus del Zika (ZIKV) pertenece a la familia *Flaviviridae* género *Flavivirus* cuyo principal vector son mosquitos del género *Aedes*. Es un virus de importancia médica debido a que sus infecciones se han asociado con el desarrollo de síndrome congénito que causa un patrón de defectos de nacimiento entre los que destaca la microcefalia. También está asociado con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré.

Los flavivirus son virus envueltos con genoma de +ssRNA de aproximadamente 11 kb que codifica para un solo marco abierto de lectura (ORF) el cual está flanqueado por regiones no traducidas (UTR) en sus extremos 5' y 3'.

Durante la infección por flavivirus, la exonucleasa celular Xrn1 degrada el RNA genómico (gRNA) en sentido 5'-3', sin embargo, las estructuras secundarias resistentes a Xrn1 (xrRNAs) del extremo 3'UTR impiden la degradación completa, lo que genera la acumulación de productos de la degradación incompleta del gRNA conocidos como RNA subgenómicos flavivirales (sfRNA). Los sfRNAs tienen diversas actividades biológicas que confieren ventajas evolutivas a los flavivirus, dentro de las que destaca la capacidad de evasión de la respuesta inmunológica, principalmente la de RNA de interferencia (iRNA) en mosquitos y de interferones de tipo I (IFNs-I) en humanos.

Durante la replicación viral, la baja fidelidad de la RdRp permite la generación de poblaciones genéticamente heterogéneas, conocidas como cuasiespecies; aquellas que tienen mayor adaptación a su hospedero tienden a tener mayor *fitness* epidemiológico. Se ha descrito que virus con alto *fitness* epidemiológico tienden a acumular más sfRNA y dada la alta diversidad genética de la población mexicana, es probable que las cuasiespecies seleccionadas en nuestro país sean diferentes a las reportadas en otras regiones endémicas, principalmente en su capacidad de acumulación de sfRNA.

En este trabajo se evaluó la capacidad de acumulación de sfRNA en células C6/36 y U937 infectadas con tres aislados de ZIKV, uno referencia (ZIKV PR) y dos mexicanos (ZIKV OAX1 y OAX2). Posteriormente se realizó la cuantificación relativa de sfRNA y gRNA mediante RT-qPCR. Los resultados se analizaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , adicionalmente los

amplicones se resolvieron en geles de agarosa para analizarlos mediante densitometría. Además, se tituló la progenie viral de los modelos celulares utilizados por inmunocitoquímica.

Los resultados mostraron que en las células C6/36 hay una correlación entre la acumulación de sfRNA y el título viral expresado por cada uno de los aislados virales, sin embargo, acumulan menores cantidades de sfRNA en comparación con la cantidad acumulada en células U937.

El aislado ZIKV OAX2 mostró ser el virus más infectivo en ambas líneas celulares y con tendencia a mayor capacidad de acumulación de sfRNA en C6/36, aunque no significativamente, pero sugiere que posiblemente las cuasiespecies seleccionadas en nuestro país podrían ser diferentes a las de otras regiones endémicas en su capacidad de acumulación de sfRNA. Sin embargo, se detectaron productos inespecíficos en las amplificaciones, probablemente por la formación de dímeros de oligonucleótidos por lo que se requiere optimizar la estrategia experimental para corroborar los resultados.

## INTRODUCCIÓN

Los virus son definidos como parásitos intracelulares obligados ya que requieren de la maquinaria celular para replicarse y generar progenie viral. Se conforman de una o varias moléculas de ácidos nucleicos donde codifican su información genética y de proteínas que encapsidan al genoma y para el caso de los virus envueltos, una membrana lipídica con glicoproteínas estructurales (Flint et al., 2015).

Los virus de la familia *Flaviviridae* causan un conjunto de enfermedades de importancia en la salud pública de nuestro país, así como de otros países, tal es el caso de la fiebre amarilla, encefalitis japonesa, enfermedad del dengue y del Zika, por lo que actualmente se mantienen bajo vigilancia epidemiológica (CENAPRED, 2018) y siguen siendo objeto de investigación.

Las infecciones por ZIKV se caracterizan por la presencia de signos y síntomas como fiebre, exantemas, artritis/artralgia, cefaleas, edemas y conjuntivitis no purulenta. Esta enfermedad no tiene cura, por lo que su tratamiento se conforma de medicamentos que controlan los síntomas (Secretaría de Salud, 2017). A pesar de que sólo un 20-25% de las infecciones presentan manifestaciones clínicas y que la mortalidad es prácticamente nula, la infección con ZIKV se ha asociado con el desarrollo de síndrome congénito que causa un patrón de defectos de nacimiento entre los que destaca la microcefalia. También está asociado con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré, enfermedad autoinmune en la que el daño neuronal ocasiona debilidad muscular o parálisis, temporal o permanente. (CDC, 2017; Song et al., 2017)

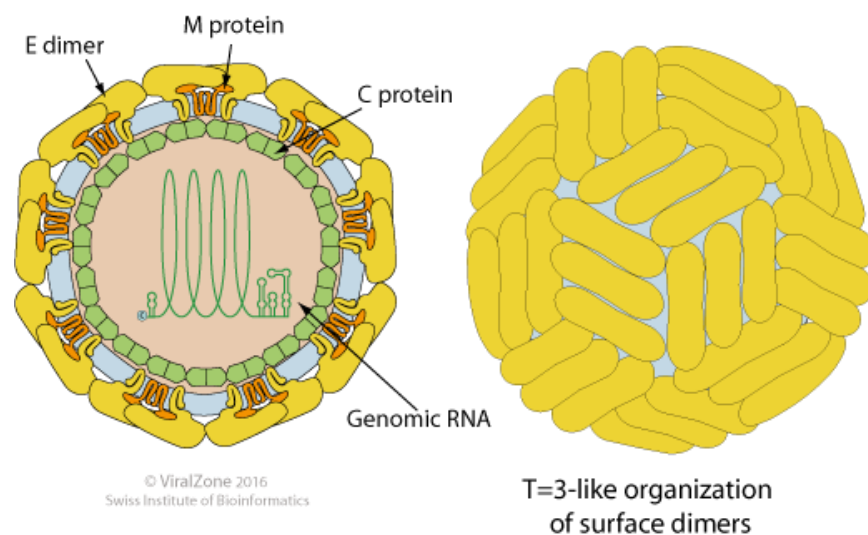
La implicación que tienen los flavivirus en la salud pública de varios países ha llevado a su estudio para el entendimiento de sus mecanismos de infección, evasión del sistema inmunológico y evolución que han favorecido la generación de fuertes brotes y con ello ampliar su propagación, con un alto potencial de invadir nuevas regiones.



significativo de ZIKV que se distribuye en zonas tropicales y subtropicales, además es una especie altamente invasiva que continuamente expande su distribución geográfica (CDC, 2016; Song et al., 2017). El ZIKV también se ha aislado de especies de mosquitos diferentes a *Aedes* como *Anopheles coustani* y *Mansonia uniformis* (Vasilakis y Weaver, 2017) sin embargo, su participación como vector potencial no ha sido confirmada.

### *Estructura de la partícula flaviviral*

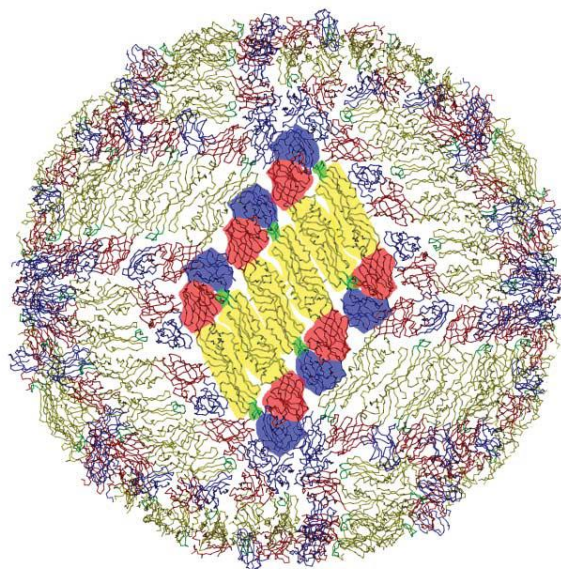
Los flavivirus son virus envueltos de un diámetro de aproximadamente 50 nm. Su material genético es una molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva (+ssRNA), la cual está contenida en una cápside proteica conformada por la proteína C viral; estos dos elementos conforman la nucleocápside (NC). La envoltura tiene una simetría icosaédrica y es de naturaleza lipoproteica ya que está conformada por una membrana lipídica derivada del hospedero y dos proteínas virales: la E (de envoltura) y la M (de membrana) unidas por dominios transmembranales (Figura 2) (Lindenbach et al., 2007).



**Figura 2. Esquema de la estructura de la partícula flaviviral madura. Tomado de ViralZone by ExPASy.**



La proteína E es una glicoproteína de aproximadamente 450 aminoácidos conformada por tres ectodominios (I, II y III) y dos dominios transmembranales. A pH neutro sus ectodominios se organizan en 90 homodímeros antiparalelos (T=3), lo que le confiere su simetría (Figura 3). Esta proteína tiene dos funciones importantes: reconocimiento de receptores celulares y regulación de la fusión de membranas para la liberación del genoma viral al citoplasma celular, ya que la disminución del pH endosomal induce un cambio conformacional de los dímeros de E exponiendo el péptido fusogénico que permite la interacción con la membrana endosomal y la liberación del genoma (Mukhopadhyay, et. al, 2005).



**Figura 3. Organización T=3 en homodímeros de la proteína E en la partícula flaviviral madura a pH neutro. En rojo dominio I, en amarillo dominio II y en azul dominio III. En verde péptido fusogénico. Tomado de Mukhopadhyay et. al, 2005.**

La proteína M se encuentra en cercanía con la E y consta únicamente de un dominio transmembranal. La maduración de esta proteína requiere de proteólisis, ya que inicialmente es traducida como proteína precursora inmadura conocida como prM cuya función como chaperona permite el acomodo y ensamblaje de la proteína E en la progenie viral (Lorenz et al., 2002). Posteriormente es cortada por la enzima celular furina en el trans-

Golgi, liberando el fragmento *pr* y a la proteína M madura (Stadler et al., 1997; Mukhopadhyay, et. al, 2005).

La proteína C consta de aproximadamente 120 aminoácidos y se organiza en dímeros para formar la NC, sin embargo, ésta no tiene una simetría bien definida. Se ha observado que la estructura de la proteína C facilita la interacción de la NC con la membrana lipídica lo cual indica que la coordinación entre la interacción proteína C-membrana y prM-E en el retículo endoplásmico es la que permite el ensamblaje de la partícula viral (Mukhopadhyay, et. al, 2005).

### *Genoma flaviviral*

El genoma de los flavivirus es una molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, de aproximadamente 11 kb la cual codifica para un solo marco abierto de lectura (ORF) flanqueado por dos regiones no traducidas (UTRs) altamente estructuradas y en su extremo 5' un CAP tipo I (m<sup>7</sup>GpppAmp) (Gebhard, et. al, 2011).

### *Cap 5'*

El cap 5' que tiene el genoma de los flavivirus es de tipo 1, es decir, que el primer nucleótido del genoma está unido a una 7-metilguanosina por medio de un 5'-5' trifosfato (m<sup>7</sup>GpppAmp) (Gebhard, et. al, 2011). Este cap es formado por la actividad metiltransferasa de la proteína NS5 viral y le permite al genoma viral ser reconocido por la maquinaria celular para la traducción de la poliproteína viral y para el mimetismo molecular que permite la evasión de su detección por PRRs citoplasmáticos. Sin embargo, se ha propuesto que la proteína RIG-1 se une al extremo 5' del RNA viral antes de que se le añada el cap para así permitir desencadenar la respuesta inmunológica antiviral mediada por interferones de tipo I (IFNs-I) (Chazal et al., 2018).

### *Marco abierto de lectura (ORF)*

El ORF flaviviral es de aproximadamente 10'233 nucleótidos y es traducido en una única poliproteína de aproximadamente 3'400 aminoácidos (Rice et al., 1985) que es procesada proteolíticamente co- y postraduccionalmente dando origen a dos grupos de proteínas: estructurales y no estructurales. En el extremo N-terminal de la poliproteína se encuentran las tres proteínas estructurales descritas anteriormente: C, prM y E. Seguidas de éstas se encuentran siete proteínas no estructurales: NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (Figura 4) las cuales son esenciales para la replicación viral (Lindenbach et al., 2007; Gebhard et al., 2011).

Una proteasa celular es la responsable de cortar entre las proteínas C/prM, prM/E, E/NS1 y 2K-NS4B, mientras que la serina-proteasa viral NS3 corta entre las proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K y NS4B/NS5 (Figura 4). Aún no se sabe la naturaleza de la proteasa del hospedero que corta entre NS1/NS2A (Lindenbach et al., 2007).

A la fecha se desconoce la función primaria de NS1, pero se asume tiene diversas funciones durante la replicación y maduración viral, adicionalmente se ha demostrado su asociación con diferentes proteínas celulares (Watterson et al., 2016). NS2A está involucrada en el ensamblaje viral además de ser un antagonista de la vía de señalización de IFNs-I junto con NS4A, NS4B y NS5 (Munoz-Jordan et al., 2003; Munoz-Jordan et al. 2005). NS2B es cofactor de NS3 para conformar la serina-proteasa viral (NS2B3) (Morrison et al., 2012).

NS3 también tiene actividad RNA 5' trifosfatasa para iniciar la formación del cap 5', así como dominios de NTPasa y RNA helicasa que participan durante la replicación viral (Issur et al., 2009; Kapoor et al., 1995). NS4A y B participan en la inhibición de la señalización de IFNs-I, además inducen la formación de estructuras membranales utilizadas como sitios de replicación viral y forman parte del complejo de replicación, respectivamente (Miller et al., 2006; Miller et al., 2007). Finalmente, NS5 tiene tres diferentes actividades enzimáticas: guanililtransferasa y metiltransferasa necesarias para la formación del cap 5', y RNA polimerasa dependiente de RNA para la replicación del genoma viral. Además, tiene

importancia en la inhibición de la respuesta de IFNs-I como se mencionó anteriormente (Morrison et al., 2012).

### *Regiones no traducidas (UTR)*

El ORF flaviviral está flanqueado por dos secuencias que no son traducidas (UTR), sin embargo, tienen funciones importantes como promotores, potenciadores o represores de la transcripción, replicación, encapsidación y la evasión de la respuesta celular antiviral, por lo que contribuyen en la regulación de la propagación del virus (Gebhard et al., 2011). Ya que flanquean al ORF se conocen como 5' y 3' UTR (Figura 4) cuyas funciones y características están mejor descritas para el virus del dengue.

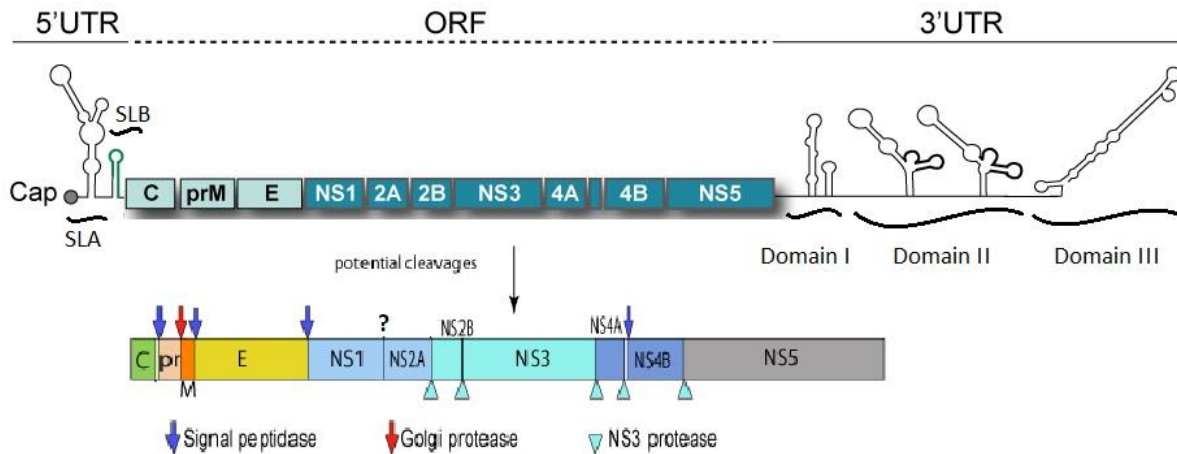
### *5' UTR*

Tiene un tamaño de 95-101 nucleótidos, aproximadamente, los cuales se hibridan entre sí formando estructuras secundarias tipo tallo-burbuja o Stem Loops (SL). El primero, denominado SLA, tiene una función promotora de la replicación ya que recluta a la RdRp (Filomatori et al., 2006; Yu et al., 2008), mientras que el segundo denominado SLB tiene una secuencia que se hibrida con el 3'UTR para la circularización del genoma, necesaria para que ocurra la replicación en dirección 3'-5' (Álvarez et al., 2005).

### *3' UTR*

Este UTR tiene un tamaño aproximado de 450 nucleótidos que forman tres tipos de estructuras secundarias. El dominio I se encuentra justo después del codón de paro del ORF y es la región más variable en el 3'UTR. El dominio II está formado por dos estructuras en "dumbbell" (DBs) que contienen secuencias conservadas en todos los MbFv y cuyas secuencias forman "pseudonudos" que participan durante la traducción y replicación viral (Manzano et al., 2011). El dominio III consta de la denominada secuencia conservada 1 (CS1) que contiene regiones complementarias al SLB del extremo 5'UTR para asegurar la interacción RNA-RNA que ocurre durante la replicación (Hahn et al., 1987), finalmente se

encuentra el elemento 3'SL que también participa en la traducción y replicación viral además de ser altamente conservado entre los flavivirus (Gebhard et al., 2011).



**Figura 4. Esquema del genoma flaviviral y sus elementos cap 5', 5' y 3' UTR, así como los principales dominios de cada uno de ellos. En la parte inferior, procesamiento de la poliproteína por proteasas celulares y virales con su respectivo sitio de corte. Modificado de Gebhard et al., 2011 y ViralZone by ExPASy.**

### *Ciclo replicativo*

#### *Reconocimiento y entrada*

Como se mencionó anteriormente, la proteína E regula la entrada del virus mediante endocitosis mediada por receptor, en la que sus residuos glicosilados regulan la especificidad con que se unen a los receptores celulares (Navarro et al., 2003). Se han identificado como receptores primarios de DENV a DC-SIGN, GRP78/BiP y moléculas asociadas a CD14 (Mukhopadhyay, et. al, 2005). Para ZIKV la mayoría son de la familia de las lectinas tipo C (CLRs), además de otros receptores de fosfatidilserina de las familias TIM y TAM (Agreli et al., 2019).

Una vez que la partícula viral se ha adherido y ha sido reconocida, la célula la internaliza por endocitosis, colocándola en un endosoma temprano a pH neutro.

### *Desencapsidación*

La disminución del pH en el endosoma tardío induce cambios conformacionales en la proteína E donde los dímeros se reorganizan en monómeros lo que permite exponer los péptidos fusogénicos; estos se acercan entre ellos formando trímeros, para posteriormente insertarse en la membrana del endosoma. En esta posición el dominio III se pliega sobre sí mismo lo que permite el acercamiento de la membrana viral con la membrana endosomal y su posterior fusión (Allison et al., 1995; Stiasny et al., 2001; Mukhopadhyay, et. al, 2005), formando un canal por donde se libera la nucleocápside hacia el citoplasma donde posteriormente se desensambla para liberar el RNA.

### *Traducción y replicación*

Ya que el genoma viral es RNA y de sentido positivo, este es traducido directamente; esto ocurre en la superficie del retículo endoplásmico rugoso de la célula, donde la poliproteína es procesada co- y post-traduccionalmente por enzimas virales y del hospedero para generar las proteínas virales ya mencionadas (Mukhopadhyay, et. al, 2005). Las proteínas estructurales prM y E una vez traducidas se traslocan al lumen del RE donde forman un heterodímero listo para el ensamblaje mientras que la C se mantiene asociada en la cara externa del RE (Lorenz et al., 2002).

Después de la traducción del RNA viral, el virus induce la hipertrofia de algunas membranas intracelulares y la formación de paquetes de vesículas donde ocurre la síntesis de RNA a los que se les conoce como complejos de replicación (Gebhard et al., 2011).

Una vez que se han traducido y procesado las proteínas no estructurales puede ocurrir la replicación en donde interviene la actividad de RdRp de la NS5 (Morrison et al., 2012). Para esto es necesario que el genoma se circularice por la hibridación de secuencias en el 5' y 3' UTR (Álvarez et al., 2005) lo que induce el reclutamiento de la NS5 comenzando la síntesis *de novo* de una cadena de RNA complementaria a la del genoma con polaridad negativa; la síntesis ocurre en dirección 3'-5'. Como resultado se forma un intermediario de RNA de doble cadena (dsRNA) (Ackermann y Padmanabhan, 2001).

Posteriormente, la actividad NTPasa y helicasa de la NS3 permiten la liberación de la cadena sencilla de sentido negativo (-ssRNA) la cual es utilizada como molde por la NS5 para la síntesis de varias cadenas +ssRNA. De manera simultánea, la NS3 hidroliza el fosfato 5' para iniciar el *capping* de la cadena y lo concluye la actividad guanililtransferasa y metiltransferasa de la NS5. Con esto se obtienen varias copias del material genético listo para su ensamblaje en nuevas partículas virales (Bartholomeusz y Wright, 1993; Ackermann y Padmanabhan, 2001).

### *Ensamblaje y maduración*

Al inicio del ensamblaje, la proteína C interactúa con el RNA sintetizado para formar un precursor de la nucleocápside el cual llega al lumen del ER para continuar con el ensamblaje de heterodímeros de prM-E y la membrana lipídica (Lindenbach et al., 2007), en este proceso la prM tiene actividad de chaperona para permitir el plegamiento y ensamblaje de E (Mukhopadhyay, et. al, 2005). Las partículas virales que salen del ER son inmaduras ya que no pueden inducir su fusión prematura con membranas del hospedero y, por lo tanto, no son infecciosas (Guirakhoo et al., 1991; Mukhopadhyay, et. al, 2005).

Para completar la maduración la partícula viral debe situarse en el trans-Golgi a pH ácido para que la envoltura se reorganice, exponga el sitio de corte de la prM y sea procesada por la proteasa celular furina; esto permite el rearrreglo de E y M en la partícula viral (Mukhopadhyay, et. al, 2005). Se ha reportado que el corte de la prM es indispensable en la maduración viral debido a que la membrana adquiere su capacidad de fusión y hemaglutinización y las proteínas de envoltura adquieren la capacidad de generar cambios conformacionales a pH ácido (Stadler et al., 1997), con esto la partícula viral es completamente madura y potencialmente infecciosa.

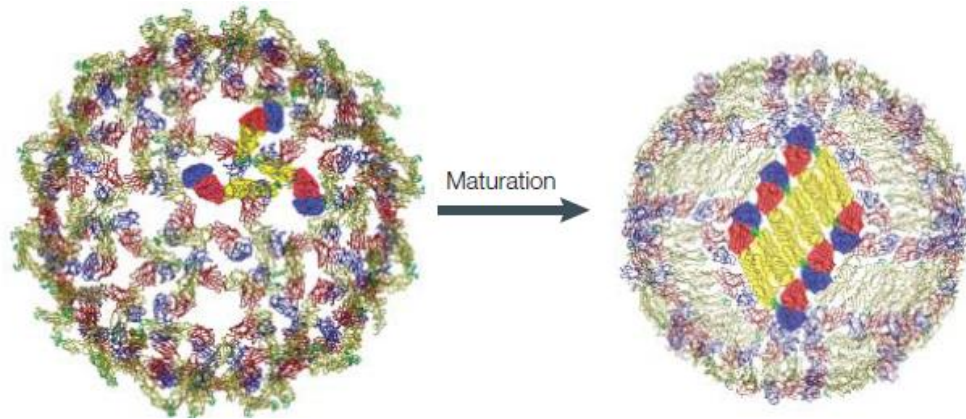


Figura 5. Rearreglo de las proteínas de envoltura flaviviral antes (izquierda) y después (derecha) de su maduración en el trans-Golgi. Tomado de Mukhopadhyay et. al, 2005.

### *Liberación*

Las partículas virales resultantes se colocan dentro de vesículas celulares para su liberación de la célula por exocitosis. Durante la liberación se expulsan partículas maduras y subvirales, estas últimas contienen proteínas de la envoltura y membrana, pero carecen de proteína C y RNA por lo que no son infectivas (Lindenbach et al., 2007).

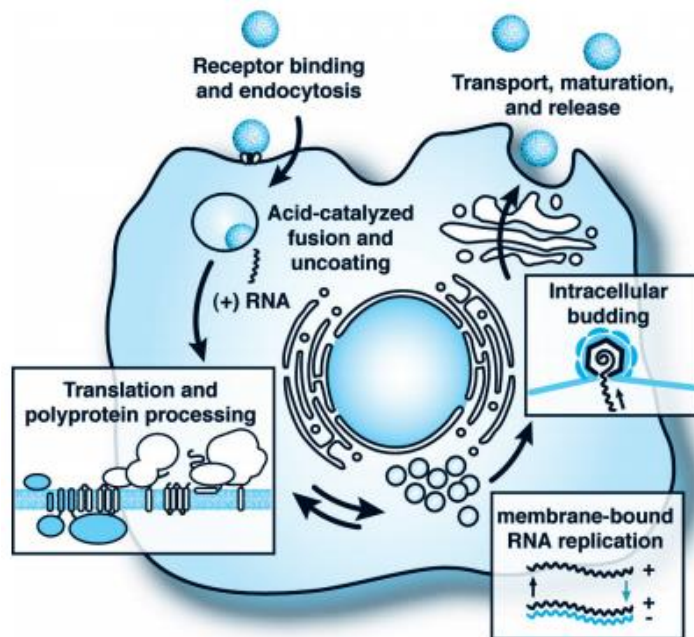


Figura 6. Ciclo replicativo de flavivirus. Tomado de Lindenbach et al., 2007



### *Respuesta celular antiviral*

El sistema inmunológico innato reconoce diversos agentes infecciosos mediante receptores conocidos como PRRs (receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos) localizados estratégicamente en regiones celulares como la superficie celular, el citoplasma o en endosomas, lisosomas y vesículas, donde reconocen moléculas simples o patrones moleculares presentes en microorganismos ajenos en la célula hospedera, conocidos como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) (Murphy, 2011).

Los principales receptores que reconocen flavivirus dentro de la célula son los receptores tipo RIG-1 (RLRs) citosólicos como RIG-1 y MDA-5, aunque se ha encontrado que algunos receptores tipo toll (TLRs) endosomales, como TLR-3 y TLR-7, también son activados para controlar la replicación viral (Morrison et al., 2012; Suthar et al., 2013).

La activación de estos receptores desencadena las vías de señalización para la transcripción de los genes de IFNs-I para la inhibición de la infección al interferir con el ciclo replicativo viral (Schneider et al., 2014).

#### *Activación por RLRs*

Los RLRs (Receptores tipo RIG-1) son PRRs citosólicos que reconocen específicamente RNA viral a etapas tempranas de infección. Para el caso de flavivirus el reconocimiento ocurre una vez que la replicación ha iniciado ya que reconocen el intermediario replicativo de dsRNA (Suthar et al., 2013).

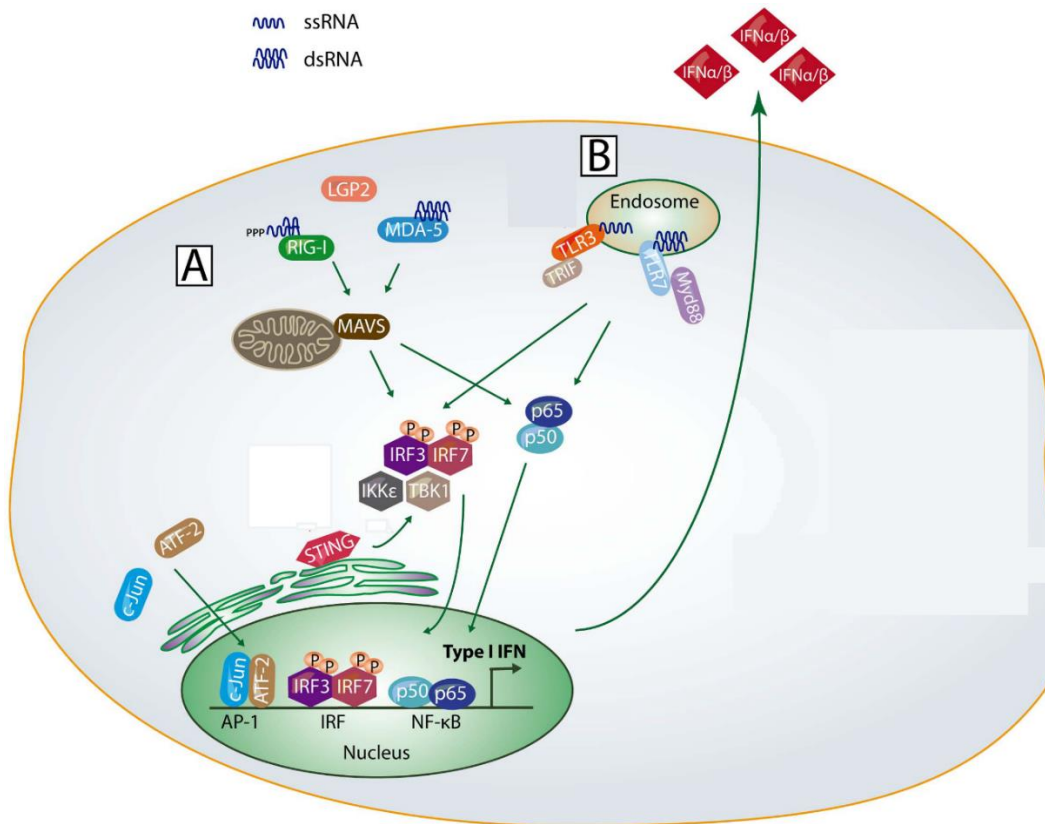
Los principales RLRs que reconocen el RNA flaviviral son RIG-1 (Gen inducible por ácido retinoico tipo 1) y MDA-5 (Factor de diferenciación del melanoma tipo 5), estos receptores se activan al reconocer estructuras en el RNA y dsRNA viral. Una vez activos interactúan con MAVS, una proteína mitocondrial señalizadora antiviral, a través de sus dominios CARD; esto activa dos cinasas I $\kappa$ B: IKK- $\xi$  y TBK1 por la vía de TRAF3; estas cinasas fosforilan dos factores reguladores de interferón (IRFs), IRF3 e IRF7, para permitir su traslocación al núcleo e inducir la transcripción de genes de IFNs-I (Kato et al., 2011) (Figura 7A).

La interacción de RIG-1 con MAVS también activa simultáneamente una molécula señalizadora que regula la activación de los genes de IFN, conocida como STING. Esta molécula al interactuar con MAVS e IRF-3 regula positivamente el reclutamiento de TBK1 para la fosforilación de IRF-3 (Zhong et al., 2008). Simultáneamente, MAVS activa el factor nuclear NF- $\kappa$ B (p50/p65) para inducir la expresión de genes de citocinas proinflamatorias (Kato et al., 2011).

#### *Activación por TLRs*

La activación mediante TLRs endosomales no es comúnmente descrita para flavivirus, sin embargo, se conoce están involucrados TLR-3 que reconoce dsRNA y TLR-7 para ssRNA (Figura 7B). El reconocimiento desencadena la fosforilación de IRF-3 e IRF-7, respectivamente, para su traslocación al núcleo, tal y como ocurre mediante la vía de los RLRs (Murphy, 2011; Suthar et al., 2013).

El ssRNA que reconocen los receptores usualmente proviene del medio extracelular dentro de partículas que al ser endocitadas exponen el ssRNA en endosomas o lisosomas. El dsRNA generado durante la replicación y ligando de las RLRs citoplasmáticas, es el intermediario replicativo producto de la replicación viral, como se mencionó anteriormente (Murphy, 2011).



**Figura 7. Esquema de la activación de las vías de señalización para inducir la producción de IFNs-I por el reconocimiento de RNA viral. A) Reconocimiento mediante RLRs. B) Reconocimiento mediante TLRs. Modificado de Suthar, et al., 2013.**

### *Interferones tipo 1 (IFNs-I)*

La respuesta celular antiviral es llevada a cabo principalmente por citocinas conocidas como interferones las cuales están clasificadas en 3 grupos. Dentro del primer grupo (IFN1) se encuentran IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  los cuales son los principales ejecutores de la respuesta antiviral debido a su amplia expresión en casi cualquier tipo celular, sin embargo, durante una infección la mayor producción de IFN- $\alpha$  ocurre en células dendríticas plasmacitoides ya que son células inmunes especializadas (Schneider et al., 2014).

Los IFNs-I tienen actividad parácrina y autócrina por lo que al ser liberadas extracelularmente, se unen a células que expresan el heterodímero de receptores IFNAR1 e IFNAR2 (IFN- $\alpha$  receptor 1/2), esto activa la cascada de señalización JAK-STAT con la cual

se induce la transcripción de genes estimulados por interferón (ISGs) cuyas proteínas interfieren en diferentes puntos del ciclo replicativo del virus estableciendo la actividad antiviral *per se*, además de reforzar y regular la señalización del interferón (Schneider et al., 2014; Coccia y Battistini, 2015).

### *Evasión del sistema inmunológico innato por flavivirus*

Los flavivirus, a través de la evolución, han desarrollado estrategias activas y pasivas que permiten la evasión del sistema inmunológico del hospedero y su vector. Se ha observado que, en etapas tempranas de infecciones con flavivirus, como DENV y WNV, se induce la formación de estructuras membranosas intracelulares donde se alojan proteínas virales no estructurales, el dsRNA y nuevo RNA; esta compartimentalización crea un microambiente parcialmente aislado en el citoplasma que evita la detección de estos componentes, retrasando la activación de la respuesta antiviral (Morrison et al., 2012; Suthar, et al., 2013).

Debido a que la respuesta de IFNs-I es una de las primeras líneas de defensa celular antiviral en primates, se ha demostrado que su inhibición es uno de los principales mecanismos utilizados por diversos virus para evitar ser reconocidos o que se impida su replicación, y así lograr establecer la infección productiva en el hospedero. Entre los flavivirus esto se ha demostrado principalmente para DENV, WNV, YFV y ZIKV (Morrison et al., 2012; Göertz et al., 2016).

En el caso de DENV, se ha demostrado que componentes virales evaden la producción y señalización de IFNs-I. Actualmente se ha identificado la actividad de la proteasa viral NS2B3 en la inhibición de la fosforilación de IRF-3 vía STING, resultando en la disminución de la producción de IFNs-I. La inhibición de la señalización de IFNs-I es realizada por la NS5 que degrada STAT2 mientras que NS2A, NS4A y NS4B inhiben la vía de señalización para la activación de STAT1 (Morrison et al., 2012).

En artrópodos la respuesta antiviral es llevada a cabo principalmente por RNAs de interferencia (iRNA) en la que la enzima Dicer corta dsRNA viral en fragmentos de 21

nucleótidos, sin embargo, también se han descrito las vías de señalización Toll, IMD, JAK-STAT y apoptosis. Se ha observado que en el vector la evasión de la respuesta antiviral dependiente de sfRNA está encaminada a la inhibición estas vías (Göertz et al., 2016).

### *RNA subgenómico (sfRNA)*

En una célula infectada por flavivirus el RNA liberado al citoplasma se conoce como RNA genómico (gRNA). Cuando éste es reconocido como extraño es degradado por la exoribonucleasa celular XRN1 en sentido 5'-3', sin embargo, su actividad es detenida debido a las estructuras secundarias formadas en el extremo 3'UTR (Pijlman et al., 2008). Estas estructuras adquieren una conformación de "pseudonudos" además de contar con secuencias resistentes a XRN1 (xrRNAs) que impiden su degradación acumulando productos de la degradación incompleta del gRNA en el citoplasma conocidos como RNAs subgenómicos flavivirales (sfRNAs) (Akiyama et al., 2016).

La formación y acumulación del sfRNA se ha asociado con la capacidad citopática del virus, ya que en células de mamífero (Vero) infectadas con virus mutantes incapaces de acumular sfRNA, se observó una disminución en la eficiencia de replicación viral y mayor viabilidad celular. De igual manera se relaciona con la patogenicidad viral ya que ratones inoculados con los virus mutantes incapaces de acumular sfRNA, no se observaron manifestaciones así como una menor mortalidad en comparación con el grupo infectado con virus parentales silvestres (Pijlman et al., 2008).

Se ha demostrado que varios flavivirus producen sfRNA para evadir la respuesta de IFNs-I, como el caso de DENV cuyo sfRNA se une a la proteína TRIM25 para inhibir la producción de IFNs-I (Manokaran et al, 2015), de igual forma se une a proteínas reguladoras de la respuesta antiviral como G3BP1, G3BP2 y CAPRIN1 para inhibir la señalización de IFNs-I (Bidet et al., 2014); ambos mecanismos favorecen la replicación en el hospedero.

El sfRNA en el vector se ha asociado con la evasión principalmente de la vía de iRNA mediante su unión a la RNAsa Dicer, evitando así el reconocimiento del dsRNA producido

durante la replicación (Slonchak y Khromykh, 2018), sin embargo, recientemente se ha descrito que el sfRNA en glándulas salivales de mosquitos *Aedes aegypti* inhibe preferencialmente la respuesta inmune tipo Toll mediante la inhibición de Rela1 y CecG (Pompon et al., 2017).

### *Epidemiología de ZIKV*

El primer aislado de virus Zika se obtuvo en 1947 en la selva de Ziika, África, donde se describió como su primer vector a *Ae. africanus*; el genotipo de este aislado se conoce como el genotipo africano. En 1966 se aisló por primera vez al sur de Asia en mosquitos *Ae. aegypti*, dando origen al genotipo asiático. Hasta 2007 se descubrió por primera vez un brote de virus Zika fuera de África y Asia, al sur del Océano Pacífico lo que dio paso a su propagación al continente americano (Song et al., 2017).

Desde 1954 se tienen unos cuantos registros de enfermedad en humanos a causa del ZIKV, sin embargo, su transmisión comenzó a ser alarmante cuando ocurrió la primera transmisión autóctona en Brasil en 2015 pues a partir de ahí se extendió a toda América Central y Sur y el Caribe, con un alto potencial de propagarse a todo el mundo (Song et al., 2017) debido a la amplia distribución geográfica del vector.

Las primeras infecciones por Zika autóctonas en México se dieron en los estados de Chiapas y Nuevo León, desde entonces se han confirmado casos en 29 estados de la República Mexicana.

Desde la reciente introducción de ZIKV a México en octubre de 2015 y hasta la fecha, se han confirmado 12'808 casos de enfermedad a causa de este virus, de los cuales 519 son autóctonos de Oaxaca (SINAVE, 2019). La epidemia del virus Zika en México llegó a su máximo nivel en 2016, año en que Oaxaca se encontró entre los estados que registraron el mayor número de casos de Zika a nivel nacional, con 488 registrados a la semana

epidemiológica 52 de 2016, junto con Veracruz (1859), Yucatán (820), Guerrero (799), Nuevo León (780) y Chiapas (759) (SINAVE, 2016).

### *Generación de variantes genéticas*

Como se mencionó anteriormente, los virus de RNA replican utilizando una RdRp la cual se ha probado tiene una alta tasa de mutación, de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  mutaciones aleatorias por nucleótido en cada ciclo de replicación. Esto permite la diversificación del genoma y por ende, de la población viral, originando lo que se denominan "cuasiespecies virales" (Kurosu, 2011). Este fenómeno también se ha observado en la replicación de la NS5 específica de DENV-2 (Jin et al., 2011).

La importancia de la generación de cuasiespecies se ha observado en otros virus como el de inmunodeficiencia tipo 1 (HIV-1) y de la familia Flaviviridae, el de la Hepatitis C (HCV). En estos virus la enfermedad se establece en un estado crónico, pero al generarse una población heterogénea de cuasiespecies se favorece la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero lo que permite la progresión de la enfermedad a un estado agudo (Kurosu, 2011).

### *Fitness epidemiológico*

Las cuasiespecies se generan durante la replicación en la célula infectada por lo que las poblaciones virales resultantes se enfrentan al sistema inmunológico del hospedero. El sistema inmunológico actúa como un "cuello de botella" que selecciona a las poblaciones más resistentes y elimina a las menos exitosas, de tal forma que aquellas mejor adaptadas al hospedero tendrán lo que se conoce como un mayor *fitness*.

Las poblaciones virales con alto *fitness* establecen la infección y un estado de viremia en el hospedero por lo que pueden ser transmitidas en el ciclo vector-hospedero, esto favorece su propagación y el establecimiento de infecciones en distintas poblaciones de hospederos.

De hecho, fuertes brotes de DENV han surgido cuando emergen nuevas variantes genéticas con mayor *fitness* epidemiológico que desplazan a las variantes endémicas (Manokaran et al, 2015).

## **ANTECEDENTES**

Desde el descubrimiento de la formación del sRNA en células infectadas con DENV-2 se ha buscado entender su función biológica. Manokaran et al. en 2015 analizaron la acumulación de sRNA en células HuH-7 y monocitos infectados con DENV de alto y bajo *fitness* epidemiológico. Para ello identificaron, mediante un estudio filogenético, la co-circulación de tres variantes genéticas de DENV-2 durante un brote de DENV grave en Puerto Rico en 1994, de acuerdo a su prevalencia dedujeron que la emergencia de DENV PR-2B desplazó la de DENV PR-1, probablemente por diferencias en su *fitness* epidemiológico.

En dicho estudio se describió que la región 3'UTR del genoma se segregaba entre ambas variantes indicando la posible influencia del sRNA en la modulación del *fitness*. De acuerdo a la cuantificación de sRNA y gRNA la proporción sRNA:gRNA es mayor en PR-2B que en PR-1, además la cuantificación de IFN- $\beta$  indica que la expresión es menor en células infectadas con PR-2B, lo cual correlaciona la formación de sRNA y la inhibición o reducción de la respuesta antiviral mediada por IFNs-I. Adicionalmente, se describió que la inhibición de IFNs-I ocurre mediante la interacción sRNA-TRIM25 la cual se observa aumentada en PR-2B en contraste con PR-1, en donde la unión del sRNA interfiere con la desubiquitinación de TRIM25. Los resultados de este estudio sugieren que el alto *fitness* epidemiológico de PR-2B es mantenido por altas concentraciones de sRNA que disminuyen la respuesta de IFNs-I, mientras que menores concentraciones de gRNA disminuyen la estimulación de los sensores de RNA RIG-1/MDA5. Este fenómeno ocurre en etapas tempranas de la infección y asegura el estado de viremia en el hospedero para su posterior propagación a nuevos hospederos (Manokaran et al. en 2015).



La función inhibidora del sfRNA en mosquitos fue evaluada por Pompon et al. en 2017. Mediante la infección de mosquitos *Aedes aegypti* con aislados de alto y bajo *fitness* donde observaron la misma tendencia de mayor tasa sfRNA:gRNA en virus de alto *fitness*. Añadieron que probablemente las glándulas salivales son un tejido específico para la acumulación del sfRNA lo que aumenta la infectividad del virus a través del mosquito, proponiendo al sfRNA como un marcador de transmisibilidad. Adicionalmente, este estudio propone que la evolución de la secuencia puede modular la epidemiología lo cual sería útil como determinante viral de la propagación de variantes con alto *fitness* epidemiológico.

A pesar de que los reportes anteriores se han realizado con DENV, desde el 2016 Akiyama et. al. demostraron que el gRNA de ZIKV presenta secuencias xrRNA's que le permiten acumular sfRNA durante la infección. Esto sugiere que ZIKV podría utilizar mecanismos de evasión del sistema inmunológico similares al DENV y que, por lo tanto, la acumulación de sfRNA puede ser un factor determinante del *fitness* epidemiológico para ambos flavivirus.

## **JUSTIFICACIÓN**

En México, desde el 2015 y hasta la actualidad, la Secretaría de Salud ha documentado casos de infección por ZIKV en estados como Veracruz, Yucatán, Guerrero, Chiapas, Oaxaca, entre otros, lo cual indica que persiste su circulación. Con base en los antecedentes, la capacidad de evasión de la respuesta de IFNs-I mediante la acumulación de sfRNA, así como su potencial impacto en la transmisibilidad, hacen su estudio de importancia para la epidemiología del ZIKV.

La mayoría de estudios enfocados a determinar factores de patogenicidad de *Flavivirus* se realizan con aislados de regiones geográficas diferentes a México, sin embargo, la diversidad genética de la población mexicana es extremadamente elevada en comparación con otras regiones endémicas para flavivirus (Moreno-Estrada et. al, 2014), por lo que las cuasiespecies seleccionadas en nuestro país podrían ser diferentes a las reportadas en otras regiones endémicas, potencialmente en su capacidad de acumulación de sfRNA.

## **HIPÓTESIS**

La acumulación de sfRNA en células infectadas con aislados mexicanos de ZIKV será diferente a la del aislado referencia de ZIKV proveniente de Puerto Rico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar la concentración relativa de sfRNA y gRNA en células humanas y de mosquito infectadas con aislados mexicanos y referencia de ZIKV.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cuantificar la concentración relativa de sfRNA y gRNA en células humanas de origen hematopoyético (U937) infectadas con aislados de ZIKV de la ciudad de Oaxaca.
- Cuantificar la concentración relativa de sfRNA y gRNA en células de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) infectadas con aislados de ZIKV de la ciudad de Oaxaca.
- Comparar la concentración relativa de sfRNA y gRNA en ambas líneas celulares infectadas y entre los aislados mexicanos y el aislado referencia de ZIKV proveniente de Puerto Rico.

## METODOLOGÍA

### *Cultivo celular*

Se utilizaron tres líneas celulares: C6/36, células provenientes del intestino medio de mosquito *Aedes albopictus*, U937, precursores mieloides de linfoma histiocítico humano y Vero, células epiteliales de riñón de mono verde (*Chlorocebus aethiops*).

Las células C6/36 se sembraron en medio MEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, L-glutamina al 1%, antibiótico al 1%, piruvato de sodio al 1%, vitaminas al 1% y aminoácidos no esenciales al 1%. Se mantuvieron en incubación a 34°C hasta confluencia para su infección.

Las células U937 y Vero se sembraron en medio RPMI suplementado con FBS entre 5 y 10%, L-glutamina al 1% y antibiótico al 1%. Se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta confluencia para su infección.

### *Virus*

Los aislados virales utilizados para las infecciones fueron el aislado referencia ZIKV Puerto Rico (ZIKVPRVABC59) (número de acceso a GenBank MH158237) y dos aislados mexicanos obtenidos en 2016 de pacientes provenientes de la ciudad de Oaxaca, con manifestaciones clínicas características de infección por virus Zika: ZIKV Oaxaca 1 (ZIKV OAX1) y ZIKV Oaxaca 2 (ZIKV OAX2).

### *Diseño de oligonucleótidos*

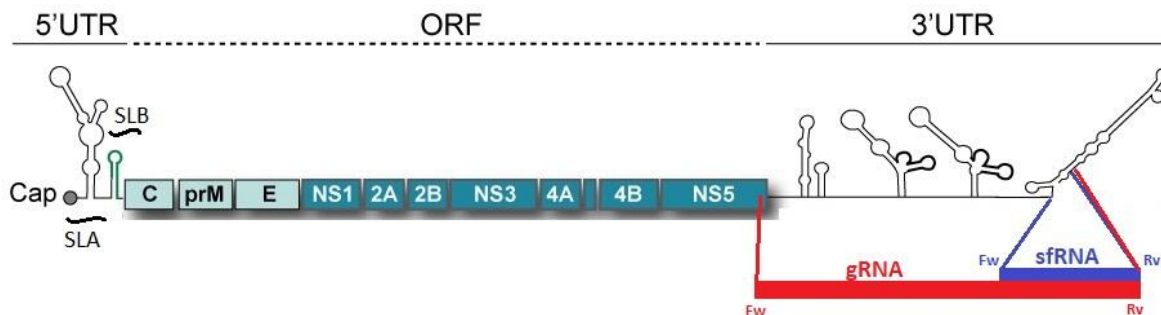
Se diseñaron oligonucleótidos utilizando como referencia la secuencia de un aislado mexicano de virus Zika obtenido en 2016 (número de acceso a GenBank KU922960.1). Sus secuencias y temperaturas de alineamiento (T<sub>m</sub>) se encuentran en la Tabla 1 y están dirigidos a las regiones del genoma de ZIKV como se indica a continuación.

### *Oligonucleótidos para sfRNA ZIKV*

Están dirigidos a la región conservada más cercana al extremo 3' del 3'UTR (Figura 8). El oligonucleótido sentido (Fw) se encuentra a partir del nucleótido 10'344, y el antisentido (Rv) es complementario a partir del nucleótido 10'579; esta región corresponde al dominio III del 3'UTR. El tamaño del amplicón esperado es de 236 pb.

### *Oligonucleótidos para gRNA ZIKV*

El oligonucleótido Fw se encuentra en el nucleótido 10'218, al final del extremo 3' del ORF, y el Rv es el mismo utilizado para el sfRNA (nucleótido 10'579); esta región corresponde al final del ORF junto con el 3'UTR (Figura 8). El tamaño del amplicón esperado es de 362 pb.



**Figura 8. Representación esquemática de las regiones del genoma de ZIKV que amplifican los oligonucleótidos diseñados. Modificado de Gebhard et al., 2011.**

### *Oligonucleótidos para GAPDH*

Se utilizó GAPDH como gen constitutivo celular para la normalización de los datos obtenidos en la qPCR. Se utilizaron oligonucleótidos previamente reportados en la literatura. El tamaño del amplicón esperado es de 264 pb.

**Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación en PCR/qPCR, así como su temperatura de alineamiento y el tamaño del amplicón esperado.**

Secuencia blanco	Secuencia 5'-3'	Tm	Tamaño del amplicón esperado (pb)
sfRNA	Fw: CTG CTA GTC AGC CAC AGC TT Rv: CTG ATC TCC AGT TCA GGC CC	58°C	236
gRNA	Fw: ATG GTG CGC AGG ATC ATA GG Rv: CTG ATC TCC AGT TCA GGC CC	58°C	362
GAPDH	Fw: GTG AAG GTC GGA GTC AAC GGA T Rv: GCC AGC ATC GCC CCA CTT G	53°C (C636) 58°C (U937)	264

#### *Infecciones con aislados virales*

Para cada infección se realizó un conteo celular de C6/36 y U937 en cámara de Neubauer para la obtención de  $1 \times 10^6$  células de cada línea, las cuales fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1, a un volumen mínimo de contacto, en movimiento constante e incubación a 34°C y 37°C respectivamente, durante una hora.

Posteriormente, se agregó medio fresco para mantener la infección en incubación durante 4 días. Ambas líneas celulares fueron infectadas con cada aislado viral; cada ensayo se realizó por duplicado.

#### *Seguimiento de la cinética de infección*

##### *Obtención de muestras virales*

Durante los 4 días de infección se recolectaron 250µL del sobrenadante cada 24h y se almacenaron a -70°C hasta su cuantificación. La fracción de sobrenadante de células U937 se centrifugó a 800 rpm por 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70°C; las células se resuspendieron nuevamente en el medio de infección.

### *Titulación de sobrenadantes de la cinética de infección*

Se realizaron diluciones seriadas decimales de cada sobrenadante y posteriormente se infectaron células Vero a una confluencia del 90% en placas de 24 pozos con 100µL de la fracción de sobrenadante o dilución correspondiente, esto se realizó por duplicado por ensayo. Posteriormente se incubaron durante una hora con movimiento constante. Finalmente, se agregó medio semisólido suplementado con metilcelulosa al 1% (Sigma), 2% de FBS y 1% de antibiótico a cada pozo y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 días.

### *Inmunocitoquímica de unidades formadoras de placa (PFUs)*

Las monocapas infectadas fueron fijadas y permeabilizadas con metanol al 85% a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se incubaron con una dilución 1:2000 de anticuerpo monoclonal específico para el péptido fusogénico de flavivirus (4G2) hecho en ratón a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora con movimiento constante, posterior a su lavado las monocapas se incubaron con una dilución 1:2000 de anticuerpo secundario contra IgG (H+L) de ratón acoplado a HRP (Seracare) en las mismas condiciones. Finalmente se revelaron las placas virales agregando el sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Seracare).

### *Cálculo del título viral (PFU/mL)*

Se realizó el conteo manual de placas virales bajo microscopio estereoscópico y se calculó el título viral mediante la siguiente fórmula:

$$x = \log \left[ \bar{x} \times (10^{|\bar{y}|+1}) \right]$$

Donde:  $x$  = título viral PFU/mL

$\bar{x}$  = promedio del número de placas en ambos pozos a la dilución del conteo

$y$  = número absoluto de la dilución a la que se contabilizaron las placas

#### *Extracción de RNA*

Se extrajo el RNA total a los 4 días post-infección (dpi) mediante un protocolo fenol-cloroformo. Para esto, todo el medio de infección de las células U937 se centrifugó a 1500 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1000 $\mu$ L de RiboZol™ para dejarlo reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. A las células C6/36 se les desechó el medio y se agregó el RiboZol™ directo a la monocapa, una vez despegadas las células se recuperó todo el volumen y se dejó reposar los 5 minutos.

Posteriormente, se agregaron 200 $\mu$ L de cloroformo 99.8% y se centrifugó a 13'000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa transparente que contiene el RNA para agregarle 500 $\mu$ L de isopropanol y centrifugarla a 13'000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

A la pastilla obtenida se le realizaron dos lavados con etanol al 70% con centrifugación a 13'000 rpm a 4°C, el primero de 10 minutos y otro de 5 minutos. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 25 $\mu$ L de agua grado molecular. Finalmente se cuantificó el RNA por espectrofotometría en un equipo NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN).

#### *Síntesis de DNA complementario*

El RNA extraído se utilizó como molde para la síntesis de DNA complementario (cDNA). Para esta reacción se utilizaron 0.6 $\mu$ L de hexámeros aleatorios 3 $\mu$ g/ $\mu$ L, 1 $\mu$ L dNTPs 10mM, 1724ng de RNA y agua grado molecular hasta completar 15.7 $\mu$ L. Esta reacción se incubó a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 4 $\mu$ L de buffer de enzima retrotranscriptasa (RT) 5x y 0.3 $\mu$ L de enzima RT de leucemia murina de Maloney 200U/ $\mu$ L

(Thermo Fisher Scientific). Para la síntesis la reacción se incubó en termociclador (Techne) a 25°C por 10 minutos, 42°C por 1 hora y 70°C por 10 minutos.

El cDNA sintetizado se cuantificó mediante espectrofotometría, se fraccionó y se mantuvo en congelación a -20°C hasta su uso.

#### *Validación de la síntesis de cDNA mediante PCR punto final*

Para comprobar la síntesis de cDNA así como la amplificación de los oligonucleótidos diseñados, se realizaron PCRs punto final. Para cada reacción se utilizaron 2µL de Buffer para Taq polimerasa 10x, 1.8µL de dNTPs 10mM, 2µL de cada oligonucleótido 10µM, 1.5µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.2µL de Taq polimerasa 5U/µL (Thermo Fisher Scientific), 688ng de cDNA y agua grado molecular hasta completar 20µL. La amplificación por PCR se realizó en termociclador (Techne) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C 2 minutos, 35 ciclos de 95°C 20 segundos, 53 o 58°C 20 segundos y 68°C 30 segundos, y una extensión final a 68°C 7 minutos.

#### *Electroforesis*

Los amplicones obtenidos mediante PCR punto final y qPCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1.7% con cámara de electroforesis a 85v durante 40 minutos. Posteriormente se tiñeron en una solución de TAE 1x con 1µL de bromuro de etidio concentrado durante 10 minutos. Finalmente, se reveló el gel en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ System BIO-RAD.

#### *Cuantificación relativa mediante qPCR*

Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 96 pozos; la cuantificación de cada gen por infección se realizó por triplicado.



En cada pozo se colocaron 7.6µL de agua grado molecular, 10µL de SYBR® Green Master Mix 2x (Ampliqon), 0.4µL de Mix de oligonucleótidos Fw y Rv 10µM y 350ng de cDNA resuspendidos en 2µL de agua grado molecular, de esta manera se obtuvieron reacciones finales de 20µL. Se incluyeron controles negativos (NTC, del inglés No Template Control) por amplicón, los cuales contenían todos los reactivos con excepción de cDNA.

La cuantificación se llevó a cabo en un termociclador para PCR tiempo real LightCycler® 480 (Roche) bajo las siguientes condiciones: preincubación a 95°C 15 minutos, amplificación en 45 ciclos de 95°C 30 segundos, 58 o 53°C 30 segundos y 72°C 30 segundos.

Además, se realizó una curva de disociación (*melt curve*), iniciando desde 65°C hasta 97°C durante 1 minuto, con una preincubación a 95°C por 5 segundos.

#### *Análisis de datos*

Se analizó la expresión relativa de cada gen mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando GAPDH para la normalización de los datos.

Mediante esta fórmula se normalizaron los datos de Ct de cada amplicón con los del gen constitutivo ( $\Delta Ct = Ct_{\text{amplicón}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ ) y posteriormente se compararon los valores de  $\Delta Ct$  del sfRNA con los del gRNA ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sfRNA}} - \Delta Ct_{\text{gRNA}}$ ). Finalmente se calculó la diferencia de la expresión del sfRNA respecto al gRNA en número de veces ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

#### *Densitometría*

Se analizaron los resultados obtenidos de la electroforesis mediante densitometría utilizando el programa ImageJ y se calcularon las unidades relativas de sfRNA y gRNA respecto a GAPDH, así como de sfRNA respecto a gRNA.

## RESULTADOS

### *Seguimiento de la cinética de infección*

De acuerdo a lo observado en las figuras 9 y 11, los tres aislados virales presentaron replicación productiva caracterizada por el incremento temporalmente ascendente del título en sobrenadantes, siendo más notable en las células C6/36. Sin embargo, en la infección de monocitos, ZIKV PR y ZIKV OAX1 no aumentaron notablemente su título a partir de los 2dpi, incluso el título viral de ZIKV PR parece disminuir a los 2 y 3 dpi, no ocurre así con ZIKV OAX2 donde, además de presentar replicación productiva, los títulos máximos son superiores a los demás virus (Figura 11).

Como se mencionó previamente, la línea celular C6/36 proviene del mosquito *A. albopictus* por lo que estas células son más susceptibles y permisivas al ZIKV lo que probablemente explique los títulos superiores a los alcanzados en monocitos. Durante su cinética se observa que ZIKV OAX2 alcanzó los títulos máximos mayores, mientras que los títulos máximos de ZIKV OAX1 y ZIKV PR fueron similares, siendo ligeramente mayor el de ZIKV OAX1, sin embargo, a los 4 dpi los tres virus tuvieron título similar, entre 6.2 y 7.4 log (Figura 9).

Esta tendencia se observa en la morfología y tamaño de las placas ya que las de ZIKV PR y ZIKV OAX1 son similares y son contabilizables a las mismas diluciones (Figura 10 a-d), a diferencia de las de ZIKV OAX2 que son de mayor tamaño y que requieren mayores diluciones para ser contabilizables (Figura 10 e-f) lo cual indica mayor infectividad de este aislado.

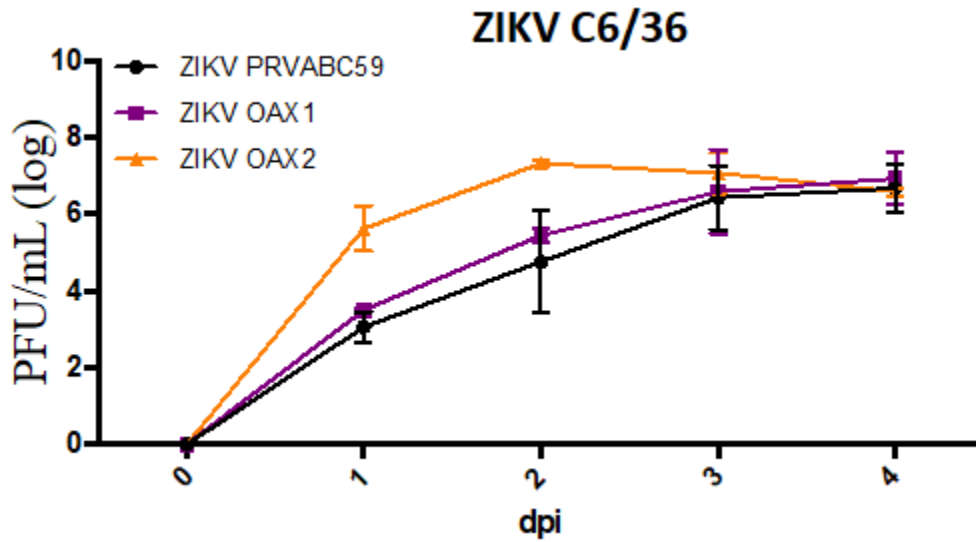


Figura 9. Cinética de infección de los tres aislados de ZIKV en células C6/36

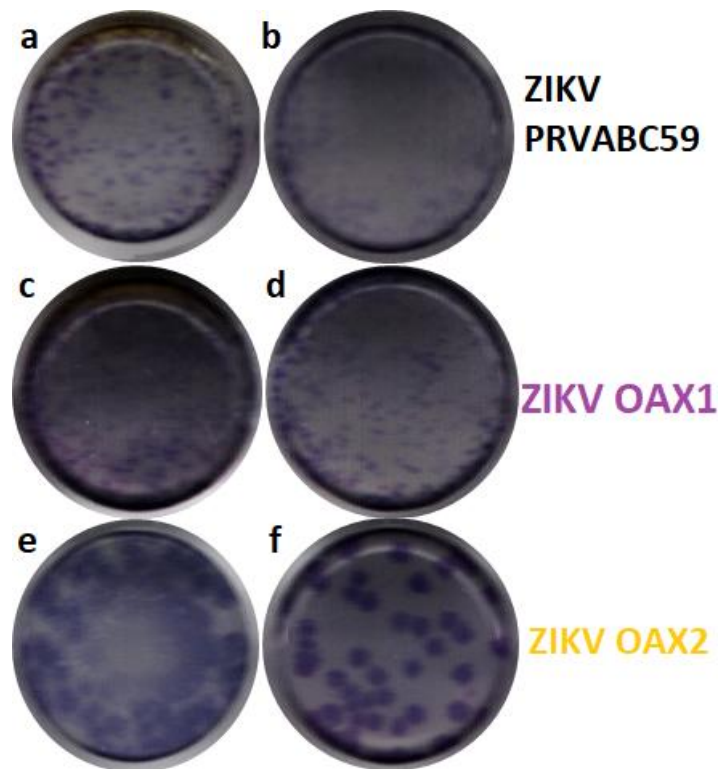


Figura 10. Morfología de placa. Sobrenadantes de células C6/36 infectadas a 0.1 MOI con ZIKV PR: a. virus concentrado, b. dilución  $10^{-4}$ ; ZIKV OAX1: c. virus concentrado, d. dilución  $10^{-4}$ ; ZIKV OAX2: e. dilución  $10^{-2}$ , f. dilución  $10^{-4}$ , recolectados 1dpi (izquierda) y 4dpi (derecha).

En la cinética de infección de monocitos infectados con ZIKV PR y ZIKV OAX1 se obtuvieron títulos entre los 3.29 y 3.63 log respectivamente, estos títulos son menores a los obtenidos en la cinética de infección de C6/36 con excepción de los obtenidos de monocitos infectados con ZIKV OAX2 cuyos títulos máximos alcanzaron hasta los 6.72 log, valor similar a los títulos máximos del mismo virus en C6/36 (Figura 9). Adicionalmente podemos observar que la diferencia entre títulos alcanzados en monocitos infectados con los tres ZIKV es similar a la diferencia observada en C6/36, donde el título mayor fue alcanzado por ZIKV OAX2, seguido de ZIKV OAX1 y finalmente ZIKV PR, sin embargo, en monocitos no hay similitud entre los títulos de ZIKV OAX1 y ZIKV PR (Figura 11).

De igual manera se observan las diferencias en la morfología de placa (Figura 12), donde las de ZIKV OAX2 son de mayor tamaño y contabilizables a diluciones mayores que las de ZIKV PR y ZIKV OAX1. Finalmente, se observa que la infección con ZIKV entre células C6/36 y monocitos es diferente ya que en monocitos las placas sólo fueron contabilizables con el virus concentrado (Figura 12), además de los menores títulos alcanzados.

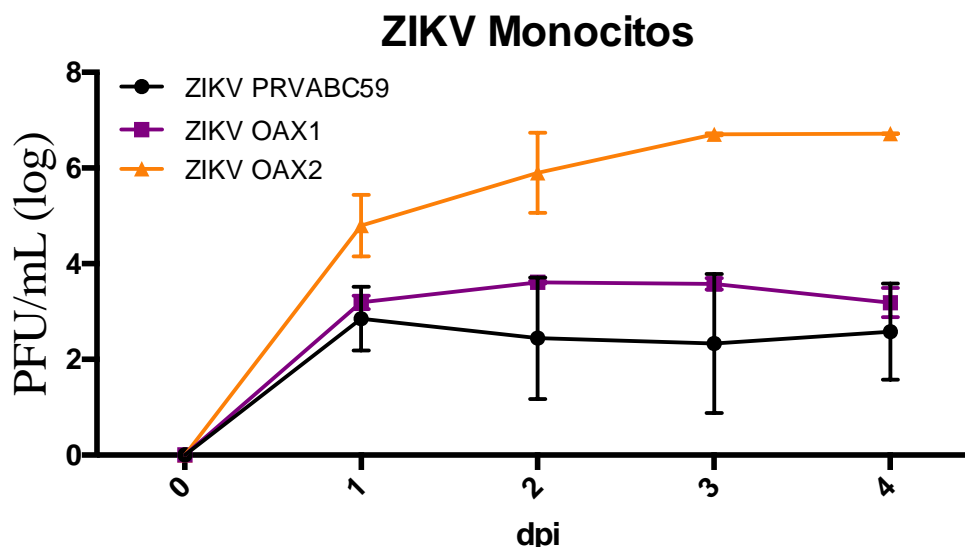
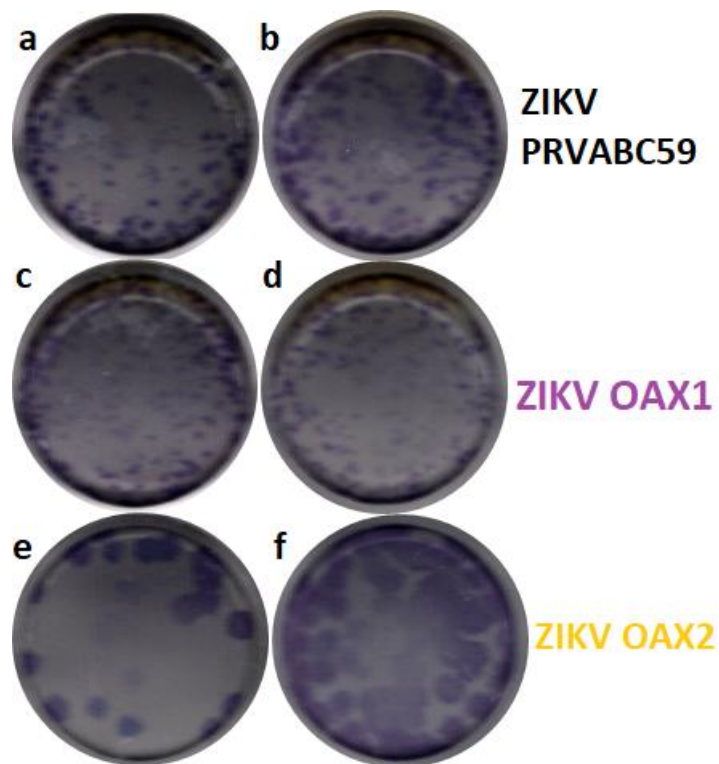


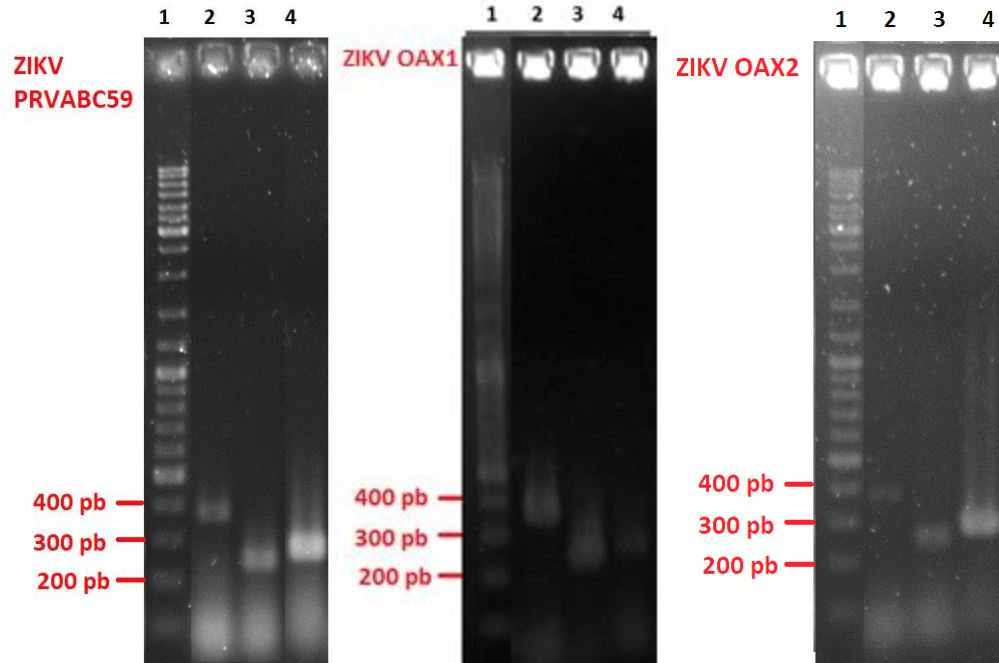
Figura 11. Cinética de infección de los tres aislados de ZIKV en monocitos (U937)



**Figura 12. Morfología de placa en sobrenadantes de células U937 infectadas a 0.1 MOI con ZIKV PR: a. y b. virus concentrado; ZIKV OAX1: c. y d. virus concentrado; ZIKV OAX2: e. dilución  $10^{-2}$ , f. dilución  $10^{-4}$  recolectados 1dpi (izquierda) y 4dpi (derecha).**

#### *Validación de la amplificación de los oligonucleótidos diseñados*

Se extrajo el RNA total de células C6/36 y U937 infectadas con ZIKV PR, ZIKV OAX1 y ZIKV OAX2 a los 4dpi para la síntesis de cDNA con el cual se comprobó, mediante PCR, la amplificación de los oligonucleótidos diseñados para las secuencias correspondientes al sRNA y gRNA. En la Figura 13 se muestran algunos de los amplicones obtenidos: gRNA 362 pb, sRNA 236 pb y GAPDH 264 pb. Todos los oligonucleótidos amplificaron en ambas líneas celulares infectadas con los tres aislados virales.



**Figura 13. Geles de agarosa 1.7%. Marcador de tamaño molecular 100 pb (carril 1). Amplificación de gRNA (carril 2), sfRNA (carril 3) y GAPDH (carril 4) con cDNA de células U937 infectadas con ZIKV PR y ZIKV OAX2 y células C6/36 infectadas con ZIKV OAX1.**

#### *Amplificación de sfRNA y gRNA mediante qPCR*

En los ensayos de qPCR se obtuvieron curvas de amplificación para sfRNA y gRNA, donde se observan amplificaciones desde ciclos tempranos. En células C6/36 infectadas con ZIKV PR se obtuvo un promedio de Ct = 15.21 de sfRNA y de 15.61 de gRNA, lo cual muestra que no hay diferencias evidentes en la concentración de ambos amplicones (Figura 14). Un caso similar ocurre en la infección con ZIKV OAX1, donde el Ct de sfRNA fue de 14.56 y el de gRNA 15.24; a pesar de haber diferencia en Ct, gráficamente no se percibe (Figura 14).

A diferencia de estos virus, sí hubo diferencia evidente en la amplificación del sfRNA y gRNA de ZIKV OAX2, aunque ocurrieron en ciclos más tardíos. El sfRNA tuvo un Ct = 19.41, mientras que el de gRNA fue de 20.70, aunque se observa la diferencia de amplificación de ambos RNAs, ésta no es significativa (Figura 14).

En conjunto estos resultados muestran que ZIKV PR y ZIKV OAX1 amplifican tempranamente, aunque sin diferencia de concentración entre sfRNA y gRNA, al contrario de ZIKV OAX2 que, a pesar de amplificar ciclos después, acumula más sfRNA que gRNA.

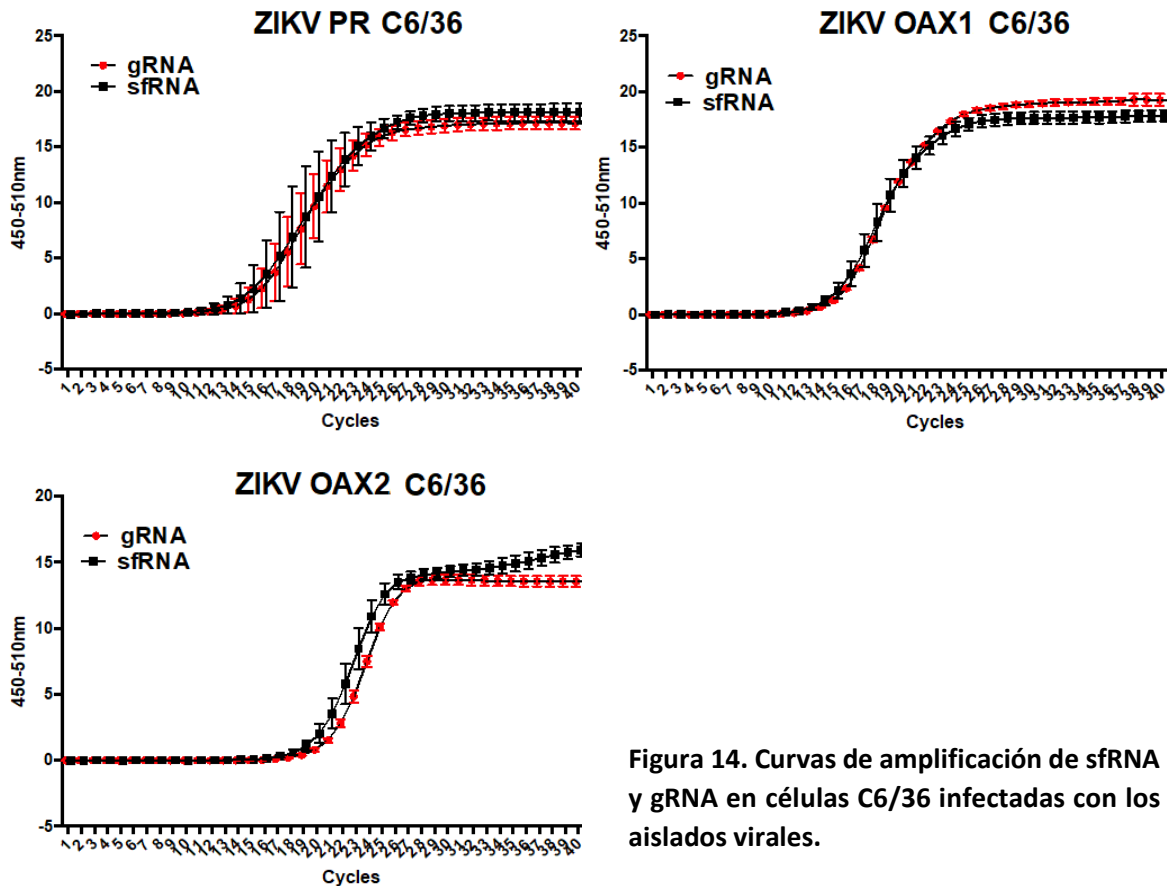
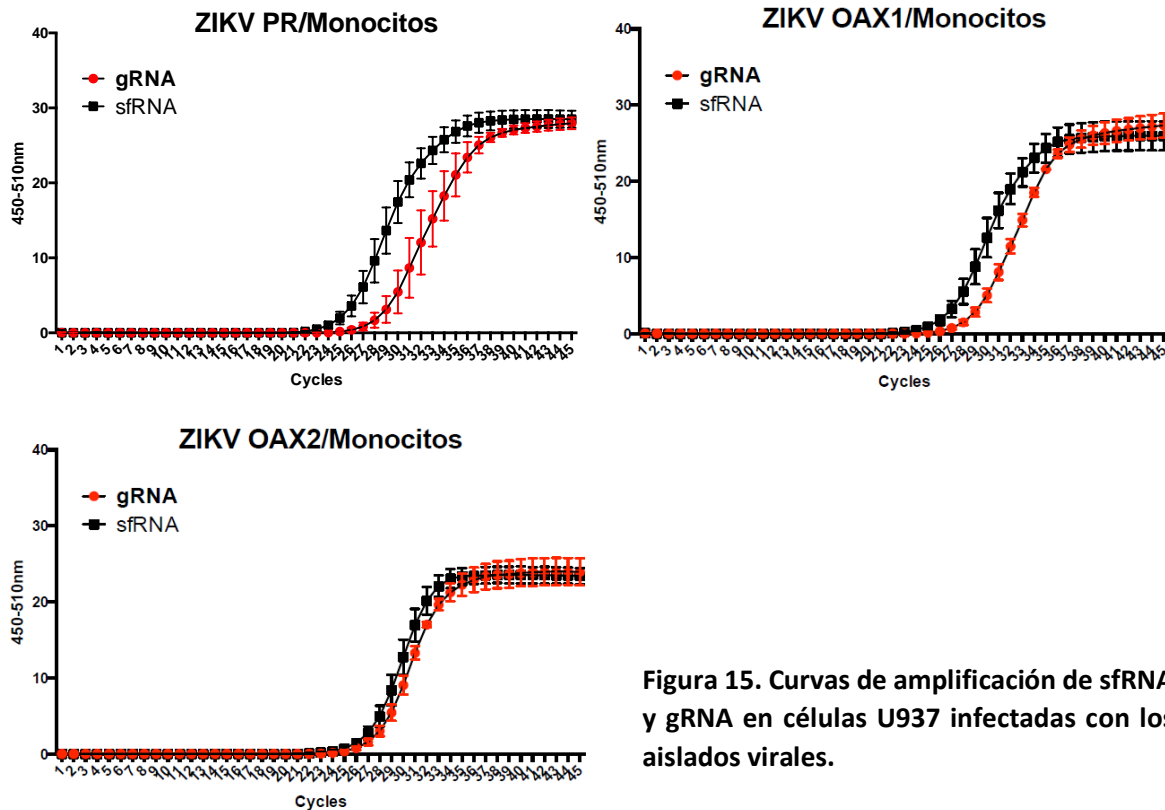


Figura 14. Curvas de amplificación de sfRNA y gRNA en células C6/36 infectadas con los aislados virales.

En monocitos las amplificaciones se observaron a partir de los 24 ciclos. El sfRNA de ZIKV OAX1 tuvo un Ct = 24.70, mientras que el de gRNA fue 26.38. Por su parte, el sfRNA de ZIKV PR amplificó con un Ct = 27.96 y el gRNA con 29.48. En estas células ZIKV OAX2 no presentó diferencias en el Ct ya que ambos productos amplificaron aproximadamente a partir de los 28.5 ciclos, cabe destacar que la diferencia entre ciclos de amplificación de los amplicones de sfRNA y gRNA es más evidente que en C6/36 (Figura 15).

Los resultados indican que en monocitos ZIKV PR y ZIKV OAX1 acumulan más sfRNA que gRNA a pesar de amplificar más tarde que en C6/36, mientras que ZIKV OAX2 es el aislado que acumula menor cantidad de sfRNA en monocitos.



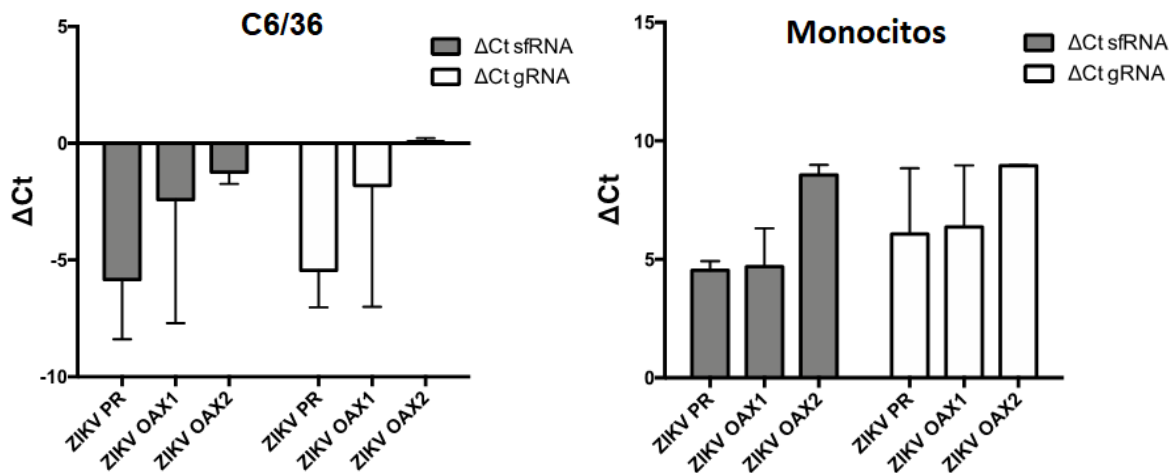
**Figura 15. Curvas de amplificación de sfRNA y gRNA en células U937 infectadas con los aislados virales.**

La diferencia en la producción de sfRNA entre C6/36 y U937 se obtuvo calculando el valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , para ello primero se normalizaron los datos del Ct de cada amplicón con los del gen constitutivo GAPDH donde se obtuvieron los resultados de  $\Delta Ct$  observados en la Figura 16. En esta figura se observa que en células C6/36 la cantidad de gRNA y sfRNA de los tres aislados de ZIKV es mayor a la de GAPDH ya que el valor de  $\Delta Ct$  es inversamente proporcional a la cantidad de sfRNA y gRNA presente en la muestra, de acuerdo a esto ZIKV PR a los 4dpi produce la mayor cantidad de gRNA, es decir tiene mayor replicación y acumula la mayor cantidad de sfRNA; le siguen ZIKV OAX1 y finalmente ZIKV OAX2.

Los datos de  $\Delta Ct$  de los monocitos muestran que la cantidad de gRNA y sfRNA de los tres aislados de ZIKV a los 4dpi es menor a la de GAPDH, en estas células ZIKV PR y ZIKV OAX1 tienen una cantidad similar de gRNA y sfRNA mientras que ZIKV OAX2 tiene la menor cantidad.



Con estos resultados podemos sugerir que los tres aislados de ZIKV replican más eficientemente y acumulan más sfRNA en células C6/36, siendo ZIKV PR el mayor y ZIKV OAX2 el menor de todos, sin embargo, esta diferencia no es significativa.



**Figura 16. Normalización de los datos de Ct ( $\Delta$ Ct) de sfRNA y gRNA con GAPDH en C6/36 y monocitos.**

Al calcular la diferencia de la acumulación del sfRNA respecto al gRNA sintetizado mediante el factor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  observamos que en C6/36 la acumulación de sfRNA en la infección con ZIKV OAX2 es ligeramente mayor, aunque no lo suficiente para alcanzar significancia estadística, en comparación con la acumulación de sfRNA en las infecciones con ZIKV PR y ZIKV OAX1 donde la acumulación de sfRNA es similar (Figura 17). Estos resultados correlacionan con los títulos virales alcanzados por cada uno de los aislados de ZIKV (Figura 9) donde ZIKV OAX2 alcanzó los mayores títulos seguido de ZIKV PR y ZIKV OAX1 cuyos títulos fueron similares durante los cuatro días de infección.

La acumulación de sfRNA fue mayor en monocitos que en C6/36, sin embargo, en monocitos no hay una correlación con los títulos virales de los aislados de ZIKV ya que los resultados del factor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  muestran que ZIKV OAX2 acumula la menor cantidad de sfRNA (Figura 17) a pesar de generar la mayor cantidad de progenie viral (Figura 11). En la infección con ZIKV

PR ocurre lo contrario ya que acumula la mayor cantidad de sfRNA, pero genera la menor cantidad de progenie viral.

Los resultados de este análisis no son significativos, pero se observa que existen diferencias en la capacidad de replicación y de acumulación de sfRNA entre los aislados de ZIKV analizados.

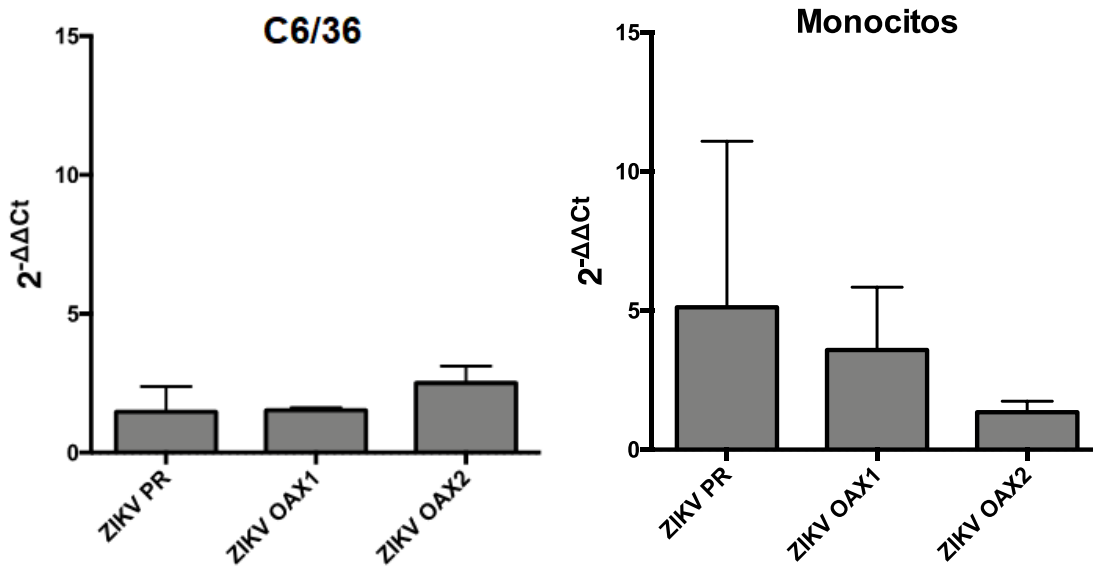
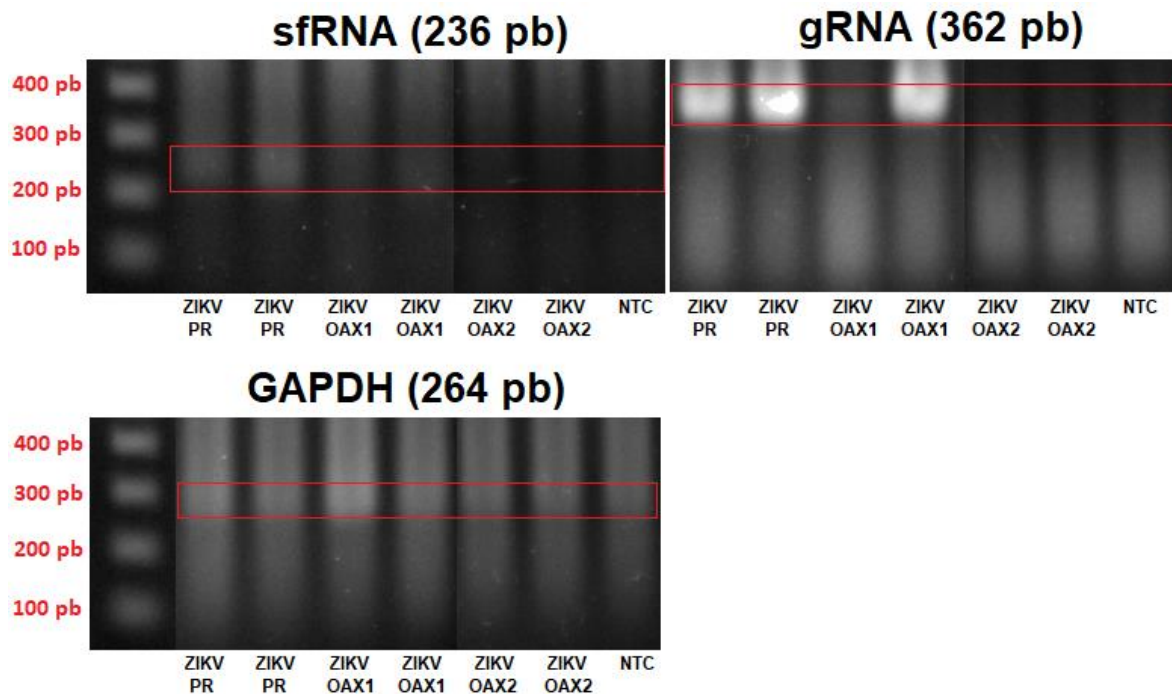


Figura 17. Comparación de la acumulación relativa de sfRNA de los aislados virales en ambas líneas celulares mediante el valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### Densitometría de los amplicones obtenidos mediante qPCR

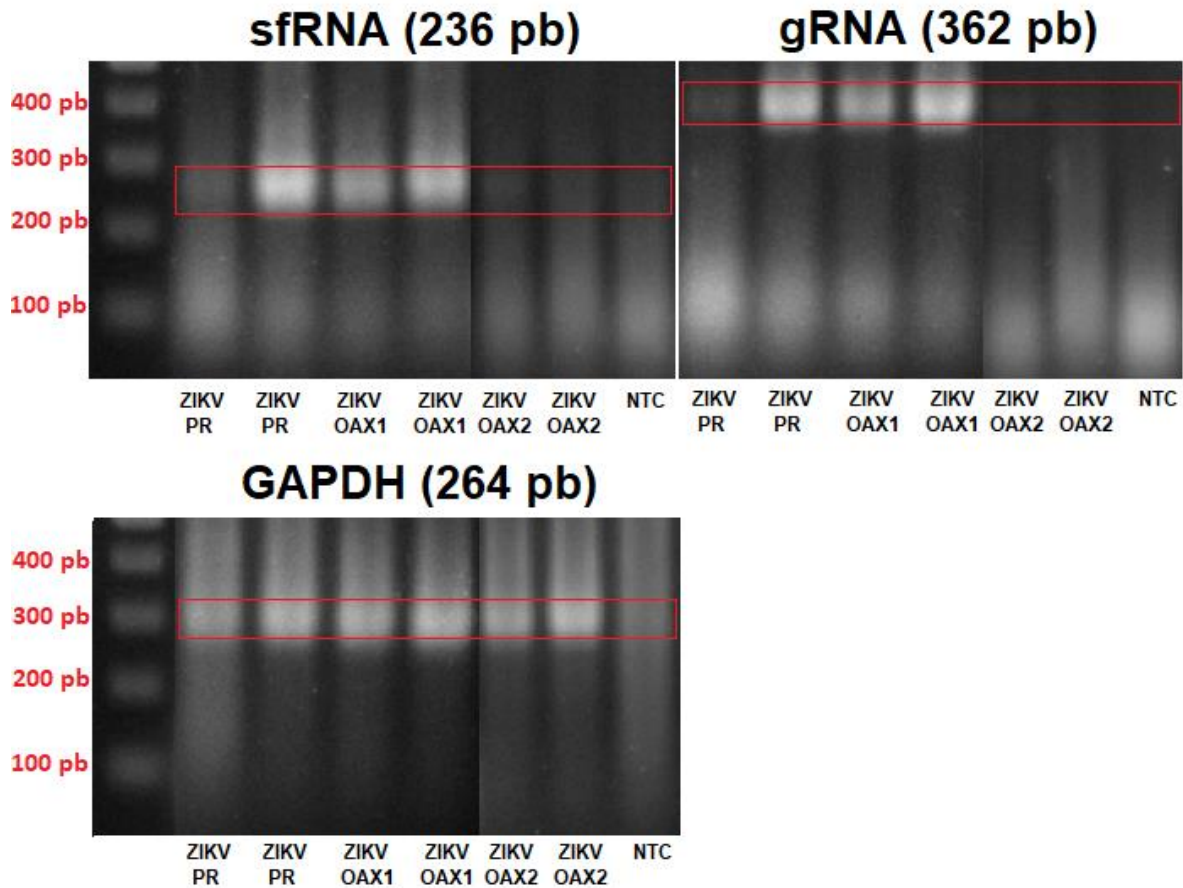
Debido a la detección de señal de amplificación en los NTC se resolvieron las mezclas de reacciones en geles de agarosa mediante electroforesis. En la Figura 18 se observa que las reacciones correspondientes a las infecciones de células C6/36 con ZIKV PR y ZIKV OAX1 presentan el amplicón esperado para el sfRNA de 236pb, pero se observa de baja intensidad. En estas mismas células el amplicón de 362pb esperado para el gRNA se observó de mayor intensidad en las infecciones con ZIKV PR y ZIKV OAX1. Por el contrario, ninguna de las infecciones en C6/36 con ZIKV OAX2 mostró algún amplicón de sfRNA y gRNA definido. Todas las reacciones de GAPDH en células C6/36 presentan un barrido, sin

embargo, se alcanza a observar el amplicón en el tamaño esperado (264pb). Los NTC de cada amplicón también mostraron un barrido que se consideró en el análisis de resultados mediante densitometría, pero en estas reacciones no se observa ningún amplicón definido (Figura 18).



**Figura 18. Electroforesis de los amplicones de sfRNA, gRNA y GAPDH obtenidos mediante qPCR de las infecciones con ZIKV PR, ZIKV OAX1 y ZIKV OAX2 en células C6/36.**

Los amplicones esperados de sfRNA y gRNA de las infecciones en U937 con ZIKV PR y ZIKV OAX1 están bien definidos y la intensidad de los amplicones es similar entre ellos, con excepción de una reacción de ZIKV PR. La infección de U937 con ZIKV OAX2 tampoco mostró amplicones de sfRNA y gRNA definidos, pero el amplicón de GAPDH se observa claramente en todas las reacciones. Los NTC de los amplicones muestran un barrido, pero ningún amplicón definido (Figura 19).



**Figura 19. Electroforesis de los amplicones de sfRNA, gRNA y GAPDH obtenidos mediante qPCR de las infecciones con ZIKV PR, ZIKV OAX1 y ZIKV OAX2 en células U937.**

La densitometría se realizó con los amplicones presentados previamente; a través de ella se observa que en células C6/36 las unidades relativas (RU) de gRNA son mucho mayores a las RU de sfRNA en las infecciones con ZIKV PR y ZIKV OAX1, mientras que en la infección con ZIKV OAX2 las RU de gRNA son apenas ligeramente mayores a las de sfRNA. Al comparar las RU de sfRNA y gRNA entre virus, el gRNA es muy similar entre ZIKV PR y ZIKV OAX1, pero mucho menor en ZIKV OAX2, mientras que el sfRNA es mayor en ZIKV PR seguido de ZIKV OAX1 y finalmente ZIKV OAX2 (Figura 20a). Sin embargo, debido a la amplificación inespecífica observada en el NTC (Figura 18) la densitometría muestra que los productos cuantificados en ZIKV OAX2 probablemente no son de los amplicones esperados.

De acuerdo al cociente sfRNA/gRNA de las RU, ZIKV OAX2 tendría la mayor producción de sfRNA, seguido de ZIKV PR y ZIKV OAX1 (Figura 20b)

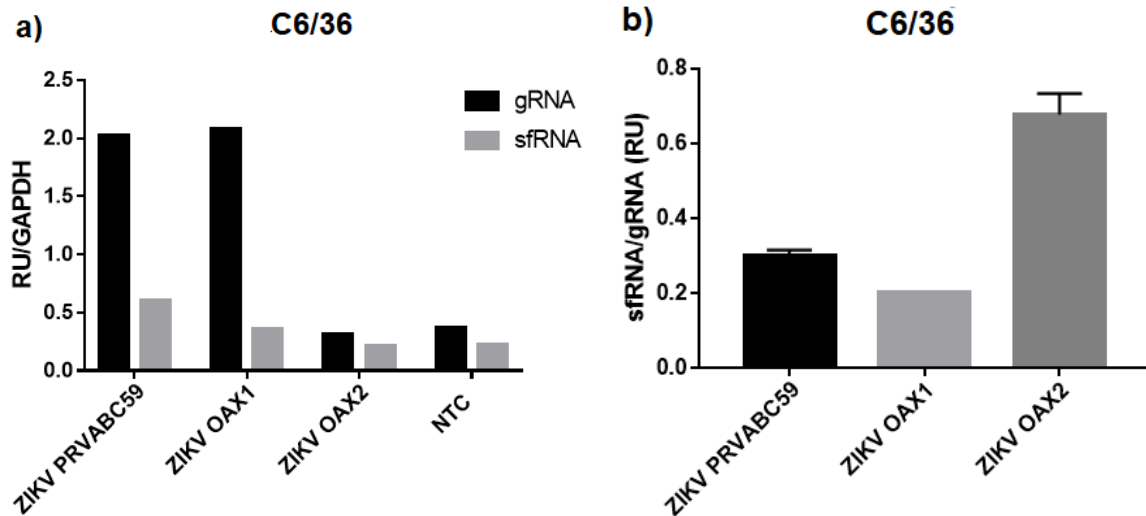


Figura 20. a) Unidades relativas (RU) de sfRNA y gRNA respecto a GAPDH en células C6/36. b) Unidades relativas de sfRNA respecto de gRNA en C6/36.

En monocitos se observa que la diferencia en RU de los amplicones de sfRNA y gRNA no es tan evidente como en C6/36 (Figura 21a), pero son ligeramente mayores las de sfRNA en los tres virus. A pesar de que no hay diferencias significativas, hay una tendencia de incremento de las RU de sfRNA en ZIKV OAX1, seguido de ZIKV PR y finalmente ZIKV OAX2, mientras que las RU de gRNA son similares entre ZIKV PR y ZIKV OAX1, las menores son las de ZIKV OAX2. Al realizar el cociente sfRNA/gRNA observamos que ZIKV PR y ZIKV OAX2 tienen la tasa más alta de sfRNA, seguidos de ZIKV OAX1 (Figura 21b).

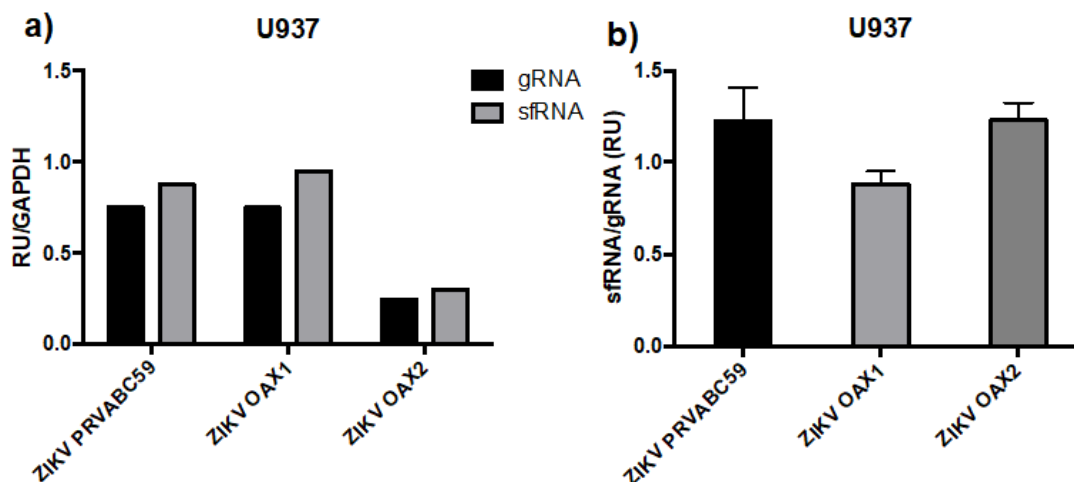


Figura 21. a) Unidades relativas (RU) de sfRNA y gRNA respecto a GAPDH en células U937. b) Unidades relativas de sfRNA respecto de gRNA en U937

## DISCUSIÓN

Para que una infección viral se considere productiva se requiere que la célula hospedera sea susceptible, es decir que permita la entrada del virus, y permisiva, que la maquinaria celular pueda mantener la replicación del virus (Flint et al., 2015). Como resultado se liberan partículas virales infecciosas encargadas de la diseminación del virus. De acuerdo a estos criterios cada tipo de célula permite el establecimiento de infecciones productivas para el ZIKV de manera diferente; las células C6/36 son altamente susceptibles y permisivas lo que se ve reflejado en los títulos virales (Figura 9). Sin embargo, los títulos en la cinética de infección en monocitos, o U937, con los aislados de ZIKV evidencian susceptibilidad, pero sugieren menor permisividad ya que los títulos virales son menores. (Figura 11).

Chan et al. en 2016, y Barreto-Vieira et al. en el 2017, analizaron la cinética de infección de ZIKVs en varias líneas celulares, entre ellas C6/36 y U937. Observaron que en U937 hay menor replicación viral que en C6/36 y que, además, los títulos tienden a disminuir a lo largo del tiempo, probablemente por la inducción de la muerte celular, mientras que en C6/36 la

infección es mayor y creciente lo que podría indicar mejor adaptación en estas células (Barreto-Vieira et al. en el 2017). Cabe mencionar que las células U937 utilizadas en este proyecto expresan DC-SIGN, receptores primarios de DENV, a diferencia de las U937 utilizadas por Chan y colaboradores las cuales expresan receptores menos afines a *Flavivirus* lo cual pudo repercutir en los bajos títulos observados.

Además, se sabe que una de las funciones del sfRNA es inducir la apoptosis en células de mamíferos (Liu et al., 2014), lo cual podría explicar por qué los títulos de la infección en U937 tiende a disminuir a diferencia de las células C6/36 donde los títulos de la mayoría de los virus tienden a seguir aumentando. Para probar esta hipótesis podría evaluarse la inducción de apoptosis y compensar el sfRNA de manera exógena en ambas células para evaluar su efecto en los títulos virales.

En células de mosquito la respuesta antiviral es llevada a cabo, principalmente, por iRNA en donde la endonucleasa Dicer2 reconoce y degrada dsRNA (Göertz et al., 2016). En el ciclo replicativo de los flavivirus, es hasta la replicación del gRNA donde se generan intermediarios replicativos de dsRNA, brindándole una ventaja de tiempo en comparación con células primates donde los RLRs y TLRs son capaces de identificar ssRNA desde la entrada del virus o la liberación de su genoma al citoplasma, obstaculizando la replicación (Suthar et al., 2013). Este fenómeno podría explicar los valores de Ct observados en qPCR donde la cuantificación de sfRNA y gRNA en células de mosquito ocurre en ciclos más tempranos que en monocitos (Figuras 14 y 15) lo que sugiere que los ZIKVs estudiados están mejor adaptados al mosquito que al primate.

Se ha observado que la producción de sfRNA es necesaria para causar efecto citopático en las células (Pijlman et al., 2008), el cual es observable y cuantificable a través de la formación de placas (PFU), esto sugiere que las infecciones realizadas en este trabajo fueron exitosas y que los títulos obtenidos podrían tener una relación con la producción de sfRNA.

En el análisis de la cuantificación relativa, mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001) del sfRNA en células C6/36 (Figura 17) se observa que ZIKV OAX2 acumuló la mayor cantidad de sfRNA, además de alcanzar títulos mayores en la cinética de infección (Figura

9) lo que podría indicar una correlación positiva entre el título y la acumulación de sfRNA, ya que también se observa que la cantidad de sfRNA es similar entre ZIKV OAX1 y ZIKV PR, así como sus títulos alcanzados en la cinética de infección.

Esto no parece ocurrir en monocitos donde la cuantificación mediante qPCR muestra que el fenómeno ocurre a la inversa, ZIKV PR acumula la mayor concentración de sfRNA (Figura 17) a pesar de presentar los títulos más bajos (Figura 11), sin embargo, estos datos tienen mucha desviación estándar lo cual impide confirmar estos resultados. Por otro lado, ZIKV OAX2 acumula menor proporción de sfRNA en comparación con los demás ZIKV, pero presenta los títulos más altos lo que podría indicar que este virus es capaz de replicar en monocitos eficazmente debido a su acumulación de sfRNA, o bien, cuenta con otros mecanismos de evasión ya descritos en la literatura como la proteína viral NS2B3 que antagoniza la producción de IFNs-I, así como NS2A, NS4A, NS4B y NS5 que degradan STATs antagonizando la señalización de IFNs-I, todas caracterizadas como mecanismos de evasión de los IFNs-I por DENV (Morrison et al., 2012; Suthar, et al., 2013; Göertz et al., 2016).

En contraste a lo que indica la qPCR, las RU de la densitometría de C6/36 muestran mayor cantidad de gRNA que sfRNA en todos los virus (Figura 20a), incluso en la relación sfRNA/gRNA las RU del sfRNA no llegan a la unidad (Figura 20b). Aun así, se mantiene que la mayor acumulación de sfRNA es en ZIKV OAX2, pero a diferencia de la qPCR, la densitometría indica que ZIKV OAX1 acumula la menor cantidad de sfRNA en lugar de ZIKV PR, aunque en ambos análisis la diferencia entre estos dos virus es mínima.

En cambio, en la densitometría de monocitos sí se observa mayor cantidad de sfRNA que de gRNA como lo muestra la qPCR y a pesar de que ZIKV OAX2 tiene las menores RU de ambos amplicones respecto a GAPDH (Figura 21a), es el virus con más RU de sfRNA/gRNA junto con ZIKV PR, cuyo valor supera la unidad a diferencia de las RU de C6/36 (Figura 21b). Es probable que la resolución de la qPCR y la densitometría como estrategias de cuantificación no sean lo suficientemente altas para evidenciar diferencias sutiles en la cantidad acumulada de sfRNA, por lo que se requiere optimizar la cuantificación.



Las curvas *melt* de los amplicones de gRNA y sfRNA indican inespecificidad en la mayoría de las amplificaciones en ZIKV OAX2 de monocitos, así como de ZIKV PR y ZIKV OAX1 de ambas líneas celulares, probablemente debido a dímeros de oligonucleótidos formados durante las amplificaciones ya que se detectó fluorescencia en los controles negativos (NTC) los cuales en su mayoría son productos inespecíficos, de acuerdo a la curva *melt*, y aunque no amplifican un producto definido en el tamaño esperado, sí presentan amplificaciones inespecíficas (barridos) (Figuras 18 y 19) que podrían ser cuantificadas inespecíficamente en la qPCR de muestras con cDNA. Además, algunos resultados de la densitometría serían invalidados debido a la detección de mayores RU en los NTC que en las muestras (Figura 20a).

Aunque los resultados obtenidos no son lo suficientemente contundentes, nos permiten sugerir que existen diferencias en la capacidad de acumulación de sfRNA principalmente en células humanas, tanto entre ZIKV de diferentes regiones geográficas (ZIKV PR – ZIKV OAX1 y ZIKV OAX2) como entre virus aislados en la misma región geográfica (ZIKV OAX1 – ZIKV OAX2)

## **CONCLUSIONES**

En conjunto, estos resultados sugieren que hay una acumulación diferencial de sfRNA entre ambas líneas celulares. Las C6/36, a pesar de que generan títulos virales mayores, no requieren acumular grandes cantidades de sfRNA para lograrlo, probablemente debido a que la respuesta antiviral de los mosquitos es menos astringente que la del primate, de tal modo que la evasión dependiente del sfRNA es más eficiente. Caso contrario en los monocitos, donde para lograr una infección productiva, probablemente se requiere de mayores cantidades de sfRNA. Además, se encontró que en células C6/36 hay una correlación directa entre la acumulación de sfRNA con el título de la progenie viral.

El aislado ZIKV OAX2 mostró en tendencia ser el virus más infectivo y con mayor capacidad de acumulación de sfRNA, aunque no significativamente, evidencia que apoya la hipótesis de que las cuasiespecies seleccionadas en México podrían ser diferentes a las seleccionadas en otras regiones endémicas e incluso dentro de la misma región geográfica, principalmente en su capacidad de acumulación de sfRNA. Los resultados de los demás virus son menos consistentes. Sin embargo, se requiere eliminar las inespecificidades en las amplificaciones para corroborar estos resultados.

La optimización de la estrategia utilizada en este estudio para la caracterización de la capacidad de ZIKV de acumular sfRNA, utilizada con otros fenotipos como la evasión de la respuesta inmunológica, tienen el potencial de ser utilizadas en la vigilancia epidemiológica para facilitar un mejor entendimiento de los factores involucrados en la severidad de los brotes de ZIKV.

## **PERSPECTIVAS**

Evaluar la inducción de apoptosis y compensar el sfRNA de manera exógena para evaluar su efecto en los títulos virales.

Diseñar oligonucleótidos para las regiones correspondientes al sfRNA y gRNA que no amplifiquen productos inespecíficos que interfieran en la cuantificación. Así como de oligonucleótidos de GAPDH, u otro gen constitutivo, que sean específicos para mosquito para así evitar la detección de más productos inespecíficos.

Simultáneamente, cuantificar el sfRNA y gRNA mediante Northern blot para identificar el tamaño de las diferentes especies de sfRNA.

## LITERATURA CITADA

Ackermann M y Padmanabhan R. 2001. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J Biol Chem.* 276(43), pp. 39926–39937.

Agreli A, Rodrigues de Moura R, Crovella S y Cavalcanti LA. 2019. Zika virus entry mechanisms in human cells. *Infect Genet Evol* 69, pp 22-29.

Akiyama MB, Laurence MH, Massey RA, Costantino AD, Xie X, Yang Y, S P-Y, Nix CJ, Beckham DJ y Kieft SJ. 2016. Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science* 6316(354), pp 1148-1152.

Allison SL, Schlich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C y Heinz FX. 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J. Virol.* 69, pp. 695–700.

Alvarez DE, Lodeiro MF, Luduena SJ, Pietrasanta LI y Gamarnik AV. 2005. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* 79, pp. 6631–6643.

Barreto-Vieira DF, Jácome FC, da Silva MAN, Caldas GC, de Filippis AMB, de Sequeira PC, de Souza EM, Andrade AA, Manso PPA, Trindade GF, Lima SMB, Barth OM. 2017. Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. *PLoS one* 12(9).

Bartholomeusz A y Wright PJ. 1993. Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Arch Virol.* 128(1-2), pp. 111-21.

Bidet K, Dadlani D y 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 Pathog* 10(7).

Centro Nacional de Prevención de Desastres (CENAPRED). 2018. Epidemias en México. Coordinación Nacional de Protección Civil, México. Recuperado marzo 27, 2019 de [http://www.cenapred.gob.mx/es/documentosWeb/Tertulias/Presentacion\\_Ingl.Maria\\_Ydirin.pdf](http://www.cenapred.gob.mx/es/documentosWeb/Tertulias/Presentacion_Ingl.Maria_Ydirin.pdf)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2016. Potential Range in US. Atlanta, GA. Recuperado septiembre 19, 2018 de <http://www.cdc.gov/zika/vector/range.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. El virus del Zika. Estados Unidos de América. Recuperado marzo 28, 2019 de <https://www.cdc.gov/zika/es/index.html>.

Coccia EM y Battistini A. 2015. Early IFN type I response: Learning from microbial evasion strategies. *Semin. Immunol* 27, pp. 85-101.

Chan JF, Yip CC, Tsang JO, Tee KM, Cai JP, Chik KK, Zhu Z, Chan CC, Choi GK, Sridhar S, Zhang AJ, Lu G, Chiu K, Lo AC, Tsao SW, Kok KH, Jin DY, Chan KH, Yuen KY. 2016. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect* 5(8):e93

Chazal M, Beauclair G, Gracias S, Najburg V, Simon-Lorière E, Tangy F, Komarova AV, Jouvenet N. 2018. RIG-I Recognizes the 5' Region of Dengue and Zika Virus Genomes. *Cell Reports* 24, pp. 320–328.

Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L y Gamarnik, AV. 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* 20, pp. 2238–2249.

Flint J, Racaniello RV, Rall FG, Skalka MA y Enquist WL. 2015. Principles of Virology. Editorial American Society of Microbiology (ASM) Press. 4a edición, Estados Unidos de América,

Gebhard LG, Filomatori CV y Gamarnik AV. 2011. Functional RNA elements in the Dengue virus genome. *Viruses* 3, pp. 1739-1756.

Göertz PG, Fros JJ, Miesen P, Vogels FBC, van der Bent LM, Geertsema C, Koenraadt MJC, van Rij PR, van Oers MM y Pijlman PG. 2016. Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA Is Processed by the Mosquito RNA Interference Machinery and Determines West Nile Virus Transmission by *Culex pipiens* Mosquitoes. *J. Virol.* 90(22), pp. 10145-10159.

Gubler DJ, Kuno G y Markoff L. 2007. Flaviviruses. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B y Straus SE (Eds.), *Fields Virology*, 5a ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, PA, pp. 1153–1252.

Guirakhoo F, Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H y Kunz C. 1991. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J. Gen. Virol.* 72, pp. 1323–1329.

Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG y Strauss JH. 1987. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J. Mol. Biol.* 198, pp. 33–41.

Issur M, Geiss BJ, Bougie I, Picard-Jean F, Despins S, Mayette J, Hobdey SE y Bisailon M. 2009. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA* 15, pp. 2340–2350.

Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE y Padmanabhan R. 1995. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J. Biol. Chem.* 270, pp. 19100-19106.

Kato H, Takahasi K y Fujita T. 2011. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev* 243, pp 91-98.

Kurosu T. 2011. Quasispecies of dengue virus. *Trop Med Health* 39(4), pp. 29-36

Lindenbach BD, Thiel HJ y Rice CM. 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication. En Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B y Straus SE (Eds.), *Fields Virology* (pp. 1101–1152). 5a edición. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

Liu Y, Liu H, Zou J, Zhang B, Yuan Z. 2014. Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway. *Virology* 448, pp. 15–25.

Livak JK y Schmittgen DT. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, pp. 402-408.

Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX y Helenius A. 2002. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 76, pp. 5480–5491.

Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, Tan HC, Sessions OM, Ward AM, Gubler DJ, Harris E, Garcia-Blanco MA, y Ooi EE. 2015. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, 6257(350), 217-221.

Manzano M, Reichert ED, Polo S, Falgout B, Kasprzak W, Shapiro BA y Padmanabhan R. 2011. Identification of *cis*-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication. *J. Biol. Chem.* 286, pp. 22521–22534.

Miller S, Kastner S., Krijnse-Locker J, Buhler S y Bartenschlager, R. 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* 282, pp. 8873–8882.

Miller S, Sparacio S y Bartenschlager R. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem.* 281, pp. 8854-8863.

Morrison J, Aguirre S y Fernández-Sesma A. 2012. Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses* 4, pp. 397-413.

Mukhopadhyay S, Khun RJ y Rossmann MG. 2005. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Microbiology* (3), pp. 13-22.

Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI y Garcia-Sastre A. 2005. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79, pp. 8004-8013.

Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M y Garcia-Sastre A. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, pp. 14333-14338.

Murphy, KP. (2011). *Janeway's immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group. LLC, Reino Unido, pp. 868.

Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F y Desprès P. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* 4, pp. 723–728.

Pijlman PG, Funk A, Kondratieva N, Leung J, Torres S, van der Aa L, Liu JW, Palmenberg CA, Shi P-Y, Hall AR y Khromykh AA. 2008. A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host Microbe* 4(6), pp. 579-591.

Pompon J, Manuel M, Ng GK, Wong B, Shan C, Manokaran G, Soto-Acosta R, Bradrick SS, Ooi EE, Misse D, Shi P y Garcia-Blanco MA. 2017. Dengue subgenomic flaviviral RNA disrupts immunity in mosquito salivary glands to increase virus transmission. *PLoS Pathog*, 13(7).

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL y Strauss JH. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 4715 (229), pp. 726-733.

Schneider MW, Chevillotte DM y Rice CM. 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, pp. 513–545.

Secretaría de Salud. 2017. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por vectores. Dirección General de Epidemiología, México, pp. 64-88.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2019. Casos Confirmados de Enfermedad por virus del Zika. Semana Epidemiológica 09 del 2019. Secretaría de Salud, México.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus del Zika. 2016. Casos Confirmados de Enfermedad por virus del Zika. Semana epidemiológica 23 del 2016. Secretaría de Salud, México.

Slonchak A y Khromykh AA. 2018. Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research? *Antivir Res* 159, pp. 13-25.

Song B-H, Yun S-I, Woolley M y Lee Y-M. 2017. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol* 308, pp. 50-64.

Stadler K, Allison SL, Schalich J y Heinz FX. 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71, pp. 8475–8481.

Suthar MS, Aguirre S y Fernández-Sesma A. 2013. Innate immune sensing of Flaviviruses. *PLOS Pathogens* 9(9), pp. 397-413.

Vasilakis N y Weaver SC. 2017. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol* 22, pp. 30–35.

Watterson D, Modhiran N, Young PR. 2016. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antivir Res* 130, pp. 7-18.

Yu L, Nomaguchi M, Padmanabhan R y Markoff L. 2008. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology* 374, pp. 170–185.

Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, Lei C, He X, Zhang L, Tien P y Shu HB. 2008. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29(4) pp. 538-550.