



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Variabilidad en la capacidad de evasión de
la respuesta inmunológica innata de
aislados de *Flavivirus* circulantes en zonas
endémicas de México”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA
ILIANA ITZEL LEÓN VEGA**

**ASESOR:
DR. JOSÉ BUSTOS ARRIAGA**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORONADO FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Variabilidad en la capacidad de evasión de la respuesta inmunológica innata de aislados de *Flavivirus* circulantes en zonas endémicas de México.

Que presenta la pasante: **Ilana Itzel León Vega**
Con número de cuenta: **415029168** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Julio de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. José Bustos Arriaga</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Erik González Ballesteros</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Con todo mi amor y esfuerzo

*A mis padres, Domingo Ernesto León González y Guadalupe Vega
Macías y a mi hermano Ernesto León Vega*

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. José Bustos Arriaga, quien me dio la oportunidad de llevar a cabo este estudio. Gracias por su tiempo, dedicación y confianza durante esta etapa y sobre todo, por enseñarme a mejorar cada día y motivarme a continuar avanzando en el mundo de la investigación.

A quienes forman parte del laboratorio 17, gracias por su apoyo durante el trabajo día a día.

Agradezco el apoyo financiero para llevar a cabo este estudio al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM con los Proyectos: IA209017 e IA204117. Así como al programa de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, CONACYT con el Proyecto PN2029.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, sin ustedes todo este trabajo no habría sido posible. Gracias por motivarme a seguir adelante, por levantarme siempre que sentía que no podía más, por darme el amor más puro e incondicional, por inculcarme las ganas de seguir estudiando y superarme día con día. Gracias por estar a mi lado todos y cada uno de los días de mi vida, sin ustedes no sería la persona que soy ahora. Papi, tu tesis de QFB aquí se ve reflejada, ¡la terminamos! Mami, eres mi modelo a seguir, tu esfuerzo se refleja en esta tesis. Este trabajo es de los dos, los amo.

A mi hermano, Erny, te adoro con todo mi ser, gracias por apoyarme durante esta etapa y siempre que te he necesitado. Gracias por darme ese empujoncito extra que más necesitaba en momentos de estrés y desesperación. Gracias por ser mi mejor amigo y compartir conmigo cada momento dulce y amargo de mi vida, eres lo mejor. Te amo con todo mi corazón.

A mi abuelita Horte, gracias por tu apoyo y dedicación, por tu confianza y paciencia, por ese amor tan puro y grande que solo tú sabes dar. Este trabajo también es tuyo, te amo.

A José, por siempre brindarme amor incondicional en las buenas y en las malas. Gracias por hacerme ver las cosas positivas de todo, por ser tan tolerante y apoyarme durante este camino, gracias por confiar en mí y darme los consejos para nunca darme por vencida, te amorcito.

A mi tía Lili, Nene, mi tío Lino y mi tía Betty, por brindarme amor a pesar de la distancia, por educarme y guiarme durante mi adolescencia, por formar parte de la persona que soy ahora. Sin ustedes no me habría dado cuenta de la capacidad que tengo para sobrepasar cualquier reto o problema que se me presente, los amo. Muchas gracias.

A mis amigos, que durante la carrera me ayudaron a ser mejor, quienes me apoyaron durante altas y bajas, quienes nunca dudaron de mí y fueron parte de las experiencias más divertidas y emocionantes que viví durante la carrera. Gracias a cada uno de ustedes, contarán conmigo siempre: Fernanda Noreña, Diana Velasco, Luis David Díaz, Getsemaní Cabrera, Diana Trillanes, Benjamín Solano, Diego Ramírez y a todo mi team F-off. ¡Son los mejores!

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biología molecular e Inmunología de Arbovirus L-17 de la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

ÍNDICE

<i>Abreviaturas</i>	9
<i>Índice de figuras</i>	11
<i>Índice de tablas</i>	12
1. Introducción	13
2. Marco teórico	15
2.1. Generalidades de <i>Flavivirus</i>	15
2.1.1. Características estructurales de los <i>Flavivirus</i>	15
2.1.1.1. Proteínas flavivirales	17
2.1.1.1.1. Proteínas estructurales	18
2.1.1.1.2. Proteínas no estructurales	21
2.1.2. Ciclo de replicación de los <i>Flavivirus</i>	24
2.2. Variabilidad genética de <i>Flavivirus</i>	27
2.3. Virus del dengue y virus del Zika	28
2.3.1. Virus del dengue (DENV)	28
2.3.2. Virus del Zika (ZIKV)	29
2.4. Presentaciones clínicas e historia natural de las enfermedades causadas por DENV y ZIKV	30
2.4.1. Presentación clínica DENV	31
2.4.2. Presentación clínica ZIKV	33
2.5. Distribución y epidemiología de <i>Flavivirus</i>	34
2.5.1. Epidemiología en México	36
2.6. Respuesta inmunológica innata contra <i>Flavivirus</i>	36
2.6.1. Activación de PRRs por reconocimiento de PAMPs virales	37
2.6.2. Interferones de tipo 1	40
2.6.3. Genes estimulados por interferón	42
2.7. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica innata por <i>Flavivirus</i>	43
3. Antecedentes directos	46
4. Justificación	47
5. Objetivos	48
5.1. Objetivo general	48
5.2. Objetivos particulares	48

6. Hipótesis	48
7. Materiales y métodos	49
7.1. Muestras empleadas	49
7.2. Cultivo celular	49
7.3. Amplificación de muestras de pacientes en etapa febril	50
7.3.1 Siembra en pozos	50
7.3.2 Infección de placas	51
7.3.3 Cosecha de aislados	51
7.3.4 Pases ciegos	51
7.4 Titulación de aislados positivos mediante inmunocitoquímica	52
7.4.1 Inmunocitoquímica de unidades formadoras de placa (PFU)	52
7.5 Determinación de la presencia de la proteína de envoltura flaviviral en las muestras amplificadas por inmunofluorescencia indirecta	53
7.6 Tipificación de aislados positivos mediante RT-PCR	53
7.6.1 Extracción de RNA	53
7.6.2 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR	54
7.6.3 Tipificación	55
7.6.3.1 PCR	55
7.6.3.2 Electroforesis	56
7.7 Comparación del porcentaje de infección de células no productoras y productoras de IFN tipo 1	56
7.7.1 Infección de células Vero y HFF-1 y cosecha de sobrenadante	57
7.7.2 Titulación de los sobrenadantes	57
8. Resultados	58
9. Discusión	71
10. Conclusiones	76
11. Perspectivas	77
12. Referencias	77
13. Anexos	86

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
ADE	<i>Antibody- dependent enhancement</i> (Facilitamiento mediado por anticuerpos)
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Célula presentadora de antígeno)
C	Proteína de cápside
CARD	<i>Caspase recruitment domains</i> (Dominios de reclutamiento de caspasas)
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementario)
CHKV	Virus Chikungunya
DCs	<i>Dendritic cells</i> (Células dendríticas)
DENV	Virus dengue
DENV-1 WP	Virus dengue serotipo 1 <i>Western Pacific</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> (RNA de doble cadena)
E	Proteína E
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima)
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> (Retículo endoplásmico)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Suero fetal bovino)
HFF-1	Fibroblastos humanos
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IFN-1 (α/β)	Interferón de tipo 1 (alfa/beta)
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IKK	<i>Inhibitor of kappa kinase</i> (Inhibidor de la cinasa kappa)
IL	Interleucina
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i> (Factor regulador de interferón)
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
LDs	<i>Lipid droplets</i> (Adiposomas)
MAVS	<i>Mitochondrial anti-viral signaling protein</i> (Proteína de señalización antiviral mitocondrial)
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i> (Factor asociado a la diferenciación del melanoma)
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (Multiplicidad de infección)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensajero)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NC	Nucleocápside

NS	Proteína flaviviral no estructural
ORF	<i>Open reading frame</i> (Marco de lectura abierto)
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Patrones moleculares asociados a patógenos)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFU	<i>Plaque Forming Units</i> (Unidades formadoras de placa)
PrM	Precursor de proteína de membrana
PRRs	<i>Pathogen recognition receptors</i> (Receptores de reconocimiento de PAMPs)
RdRp	<i>RNA dependent RNA polymerase</i> (RNA polimerasa dependiente de RNA)
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RLRs	<i>RIG-I like receptors</i> (Receptores Tipo RIG-1)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RC	<i>Replicative complex</i> (Complejo replicativo)
ROs	<i>Replication organelles</i> (Organelos de replicación)
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	<i>Reverse transcription Polymerase chain reaction</i> (PCR con transcriptasa inversa)
sfRNA	RNA subgenómico
SPG	Estabilizador de Sacarosa-Fosfato-Glutamato
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> (DNA de cadena sencilla)
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i> (RNA de cadena sencilla)
TAE	Tris, ácido acético y EDTA
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores tipo Toll)
TMDs	<i>Transmembrane domains</i> (Dominios transmembranales)
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β</i> (Adaptador inductor de interferón- β que contiene dominio TIR)
TRIM25	Proteína ligada a ligasa de ubiquitina E3 25
UTR	<i>Untranslated region</i> (Región no traducida)
VPs	<i>Vesicle packets</i> (Paquetes vesiculares)
WHO	<i>World's Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud)
WNV	Virus del Nilo occidental
YFV	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus Zika
ZIKV PR	Virus Zika Puerto Rico

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la estructura de las partículas virales de los Flavivirus, mediante microscopía crioelectrónica a 3.8 Å de resolución _____	16
Figura 2. Organización del genoma de los Flavivirus _____	16
Figura 3. Estructura de los estados inmaduro y maduro de las partículas flavivirales _	17
Figura 4. Demostración esquemática de la topología de la poliproteína flaviviral asociada a la membrana _____	18
Figura 5. Aspectos estructurales de la proteína C flaviviral _____	19
Figura 6. Estructura de la proteína E de Flavivirus _____	21
Figura 7. Ciclo replicativo de DENV _____	27
Figura 8. Ciclo de transmisión de DENV en humanos y mosquitos, representativo de la transmisión horizontal de Flavivirus _____	30
Figura 9. Clasificación clínica de dengue de acuerdo a las guía emitidas por la OMS 2009 _____	32
Figura 10. Cambios en la viremia, NS1 en circulación y anticuerpos durante el curso de la enfermedad por dengue _____	33
Figura 11. Distribución global de arbovirus transmitidos por los vectores <i>A. egypti</i> y <i>A. albopictus</i> _____	35
Figura 12. Vías de señalización de TLRs inducidas por el reconocimiento de RNA flaviviral _____	38
Figura 13. Vía de señalización desencadenada por RLRs en reconocimiento de RNA flaviviral _____	40
Figura 14. Vía canónica de señalización de interferones de tipo I _____	42
Figura 15. Unidades formadoras de placas representativas de las muestras YUC 47, YUC 96 y sus duplicados en células Vero _____	58
Figura 16. Electroforesis de las reacciones de PCR obtenidas de los aislados, ZIKV PR y DENV-1 WP _____	59
Figura 17. Microscopía confocal de células Vero infectadas con las muestras YUC 47, YUC 96 y DENV-1 WP _____	61
Figura 18. Representación cualitativa de la capacidad de evasión de IFN-1 endógenos de YUC 47, YUC 96 y DENV-1 WP _____	62
Figura 19. Cinética de infección de los aislados YUC-47, YUC-96 y DENV-1 WP en células productoras y no productoras de IFN-1 _____	64
Figura 20. Efecto citopático producido en células Vero y HFF-1 por las muestras YUC-47, YUC-96 y DENV-1 WP a 5 días post-infección _____	65
Figura 21. Porcentaje de reducción de la infección de YUC-47 en comparación con DENV-1 WP, inducida por IFN-1 endógenos _____	67
Figura 22. Porcentaje de reducción de la infección de YUC 96 en comparación con DENV-1 WP, inducida por IFN-1 endógenos _____	69

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de las características y sintomatología de los donadores con presunta infección por Flavivirus utilizados durante la investigación _____	49
Tabla 2. Condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de RT-PCR para la síntesis de cDNA a partir de RNA _____	54
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de los aislados _____	55
Tabla 4. Condiciones para las reacciones de PCR de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados _____	56
Tabla 5. Lista de los amplificadores utilizados, su título viral y el volumen de suspensión viral utilizados para la infección a 0.1 MOI _____	57

1. Introducción

En años recientes, el incremento de infecciones causadas por los virus del dengue (DENV) y Zika (ZIKV), han adquirido gran importancia a nivel mundial debido al impacto que han causado sobre la salud mundial, siendo México uno de los países endémicos con un alto riesgo a estas infecciones. El DENV y ZIKV, son virus del género *Flavivirus* transmitidos por los mosquitos hembra hematófagos, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, vectores que se encuentran ampliamente distribuidos en zonas endémicas de México, por lo que la co-circulación de ambos *Flavivirus* es abundante. Además, las variaciones genéticas en la población mexicana, la afinidad a vectores, entre otros, representan presiones evolutivas y ambientales a las que los *Flavivirus* son sometidos, lo que determina la selección de variantes con una mayor capacidad de adaptación o “fitness”.

Durante este estudio, se evaluó la capacidad de evasión de la respuesta inmunológica innata de aislados de *Flavivirus*, provenientes de muestras sanguíneas de pacientes con sintomatología de infección por *Flavivirus* en zonas endémicas de México. Se aislaron y purificaron *Flavivirus* a partir de las muestras sanguíneas mediante pases ciegos en células Vero, y se cuantificaron las unidades formadoras de placa (PFUs) por inmunocitoquímica. Posteriormente, se tipificaron los aislados mediante RT-PCR y se evaluó la capacidad de evasión de la respuesta de interferones de tipo 1 (IFN-1) mediante cinéticas de infección en células productoras (HFF-1) y no productoras (Vero) de IFN-1, la capacidad de evasión se midió semi-cuantitativamente por cálculos de reducción de la infección. Se observaron diferentes fenotipos de evasión en los aislados YUC-47 y YUC-96, YUC-96 demostró ser capaz de infectar células HFF-1 con notable efecto citopático similar al virus referencia DENV-1 WP, sin embargo, YUC-47 muestra un fenotipo evasor con una constante replicación que se mantiene debido al bajo efecto citopático que produce en el cultivo celular.

El estudio permitió evaluar el fenotipo evasor de la respuesta inmunológica innata de aislados mexicanos. Los datos mostraron que ambos aislados son capaces de evadir la respuesta de IFN-1, sin embargo, muestran fenotipos de evasión distintos, relacionados con el efecto citopático que producen en modelos celulares. Esto sugiere que a pesar de que los aislados pertenecen a una misma zona geográfica y que circularon durante el mismo brote,

podrían presentar diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica innata, facilitando las infecciones productivas en la población mexicana. La obtención de los aislados permitió incrementar el número de aislados caracterizados de *Flavivirus* del banco de aislados mexicanos de la UBIMED, FESI, UNAM, que tienen el potencial de fungir como guía y referencia para estudios posteriores de *Flavivirus* mexicanos, para comprender su virulencia y apoyar a las instituciones de salud y epidemiología para el manejo de los casos de infección por *Flavivirus*.

2. Marco teórico

2.1. Generalidades de *Flavivirus*

También clasificados como arbovirus, los *Flavivirus* son uno de los cuatro géneros que comprenden a la familia *Flaviviridae* (Neufeldt, C., 2018). Dicho género contiene alrededor de 53 especies de virus, de los cuales una gran parte han sido identificados como algunos de los patógenos virales con mayor impacto sobre la salud humana. Con base en el vector que los transmite, también se clasifican en dos grupos principales: los *Flavivirus* transmitidos por garrapatas y aquellos transmitidos por mosquitos (Pettersson, 2014). Los *Flavivirus* transmitidos por garrapatas suelen ser un grupo monofilético que consiste en un solo “serocomplejo”, sin embargo, aquellos transmitidos por mosquitos tienden a ser más diversos genética y antigénicamente (Pettersson, 2014). Dentro de este último grupo se encuentran los cuatro virus del dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo occidental (WNV) y el virus del Zika (ZIKV) (Holbrook, M., 2017). Los mosquitos transmisores de estos virus, en especial DENV y ZIKV, son mosquitos hembra hematófagos del género *Aedes*, siendo las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* las más importantes durante la transmisión horizontal en ciclos urbanos (Holbrook, M., 2017).

2.1.1. Características estructurales de los *Flavivirus*

Los *Flavivirus* son virus envueltos de aproximadamente 500 Å de diámetro (Figura 1), compuestos por una cápside icosaédrica asimétrica envuelta con una bicapa lipídica, a su vez cubierta por 90 copias de homodímeros de glicoproteínas de envoltura (E) y 90 homodímeros de la proteína de membrana (M) (Lindenbach, 2001; Mukhopadhyay, S., et al. 2005; Sirohi, 2016).

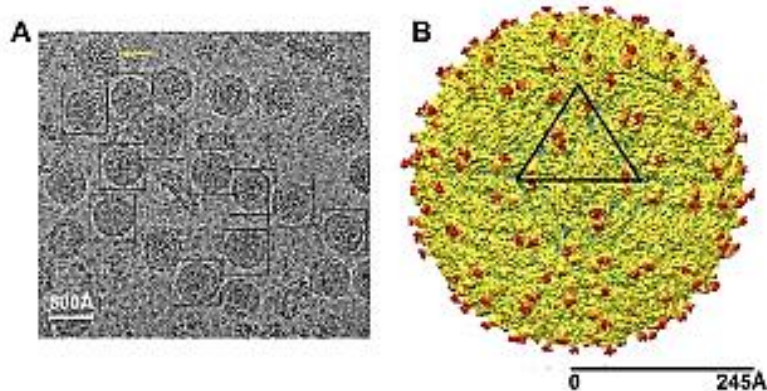


Figura 1. Representación de la estructura de las partículas virales de los *Flavivirus*, mediante microscopía crioelectrónica a 3.8 Å de resolución. A) Imagen obtenida por microscopía crioelectrónica (cryo-EM) de partículas virales congeladas y deshidratadas de ZIKV. Las partículas virales maduras se muestran destacadas por cuadros negros. B) Organización de las proteínas de envoltura, las unidades asimétricas se encuentran dentro del triángulo negro (Modificado de Sirohi D. et. al., 2016).

El genoma flaviviral (gRNA) (**Figura 2**) consta de una cadena sencilla de RNA con polaridad positiva (ssRNA(+)) de aproximadamente 10-11 kb, tamaño que varía dependiendo de cada especie. El genoma contiene un solo marco de lectura abierto (ORF) que es traducido como poliproteína, la cual es procesada co- y postraduccionalmente en 10 proteínas virales (Roby, J., 2015). Además, el genoma sirve como un templado durante la replicación del RNA y como material genético para nuevas partículas virales (Lindenbach B.D, et al., 2007).

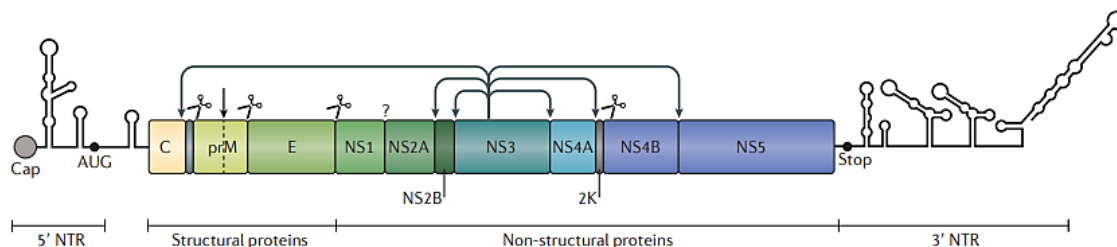


Figura 2. Organización del genoma de los *Flavivirus*. Molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, presenta regiones UTR en los extremos 5' y 3'. El extremo 5' presenta un Cap tipo I; el extremo 3' no presenta poliadenilación. Se traduce en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y en siete NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Algunos *Flavivirus* presentan una octava NS, 2K. Los sitios de procesamiento por proteasas celulares se indican con tijeras. Las flechas verticales indican procesamiento de la poliproteína por proteasas virales (Neufeldt, C., 2018).

Una característica distintiva del genoma, es la presencia de regiones no traducidas (UTRs o NTRs) altamente estructuradas que flanquean al único marco de lectura abierto (ORF) en

los extremos 3' y 5' (Lindenbach, B.D, 2003). El extremo 5'UTR representa el extremo más corto con 100 nt y cuenta con un cap tipo I (m⁷GpppAmpN1) (Ng WC, et. al., 2017), necesario para el reconocimiento por los ribosomas. El extremo 3'UTR presenta entre 400 a 700 nt que, a diferencia del mRNA celular, carece de una cola poliadenilada (poliA) (Roby, J., 2015; Sirohi D. et. al., 2016; Ng WC, et. al., 2017). Las zonas UTR promueven la interacción entre el extremo 3' y el 5' debido a la presencia de secuencias complementarias, permitiendo procesos de circularización del gRNA durante la replicación, como lo es el reclutamiento y correcto posicionamiento de la RNA polimerasa viral (Ng W., et. al., 2017).

Durante el ciclo replicativo, los viriones se encuentran en tres estados principales: inmaduro, maduro y fusogénico (**Figura 3**), que son no infecciosos, infecciosos y de unión a membrana de la célula hospedera, respectivamente (Holbrook, M., 2017).

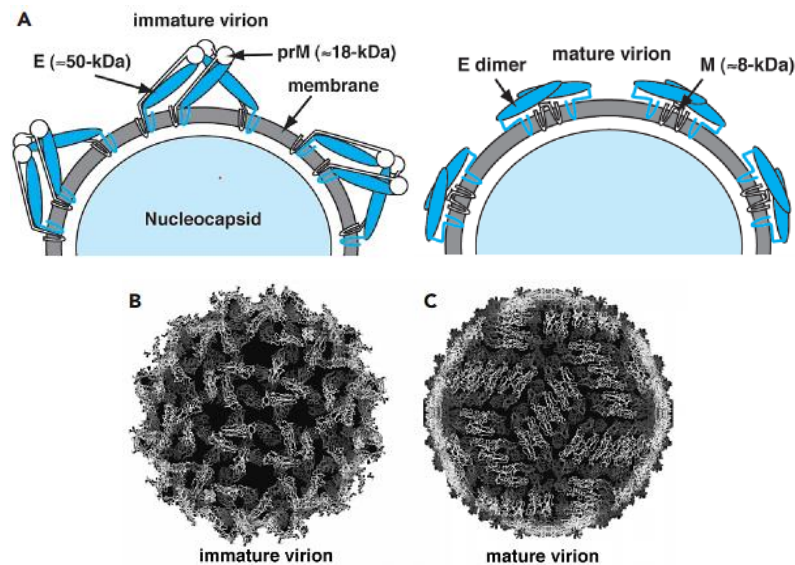


Figura 3. Estructura de los estados inmaduro y maduro de las partículas flavivirales. A) Conformación de la proteína de envoltura de viriones inmaduros y maduros. **B)** Reconstrucción por Cryo-EM de partículas de DENV-2 inmaduras. **C)** Reconstrucción por Cryo-EM de partículas de DENV-2 maduras (Modificado de Lindenbach B.D, et al., 2007).

2.1.1.1. Proteínas flavivirales

Las proteínas virales (**Figura 4**) se producen a partir de la traducción del ORF, en una poliproteína conformada por más de 3000 aminoácidos, la cual es procesada proteolíticamente por proteasas virales y celulares (**Figura 2**). El extremo amino terminal de la poliproteína, codifica para las tres proteínas estructurales que constituyen a la partícula

viral (Proteína C, prM y E). El resto de la poliproteína, es procesada en siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, que son esenciales durante la replicación viral (Mukhopadhyay, S., et. al. 2005).

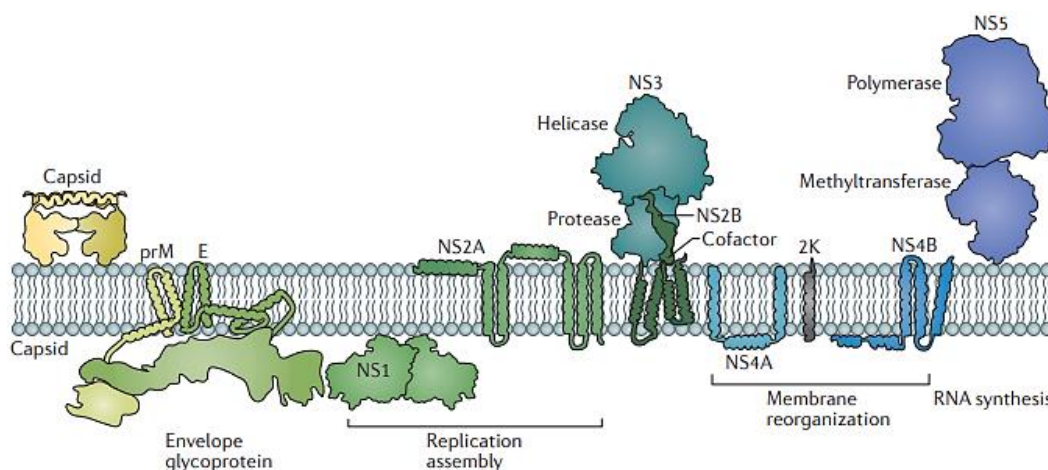


Figura 4. Demostración esquemática de la topología de la poliproteína flaviviral asociada a la membrana. Las proteínas estructurales C, E y prM constituyen al virión. NS1, que reside en el lumen del ER, junto con NS2A participan en la replicación y producción de partículas virales infecciosas. NS2B participa como cofactor para la serina-proteasa NS3. NS4A y NS4B funcionan como proteínas para la reorganización membranar. NS5 enzima con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y metiltransferasa (Neufeldt, C., 2018).

2.1.1.1.1. *Proteínas estructurales*

Proteína de cápside (C)

La proteína C es una proteína citosólica de aproximadamente 12 a 14 kDa, que tiene afinidad por membranas lipídicas y ácidos nucleicos. Su estructura secundaria consiste en un monómero con cuatro hélices alfa (**Figura 5**), α_1 - α_4 , que cumplen diversas funciones (Samsa, M. et. al., 2009). La hélice 1 (α_1), ubicada en el extremo aminoterminal de la proteína, posee aminoácidos de carácter básico que se asocian fuertemente al RNA recién sintetizado, permitiendo su organización en el interior de las partículas virales, formando así un complejo riboproteico o nucleocápside (NC) que protege al genoma viral de la degradación. La nucleocápside mantiene su estabilidad debido a la interacción coordinada de homodímeros antiparalelos de la proteína C que rodean con gran afinidad al RNA viral (Schneemann A., 2006; Velandia, M., 2011; Oliveir, E., et. al., 2016). Las hélices 3 y 4 (α_3 y α_4) sirven de anclaje al retículo endoplásmico (ER). La hélice 2 (α_2), se caracteriza por ser

altamente hidrofóbica, lo que le permite interactuar con adiposomas (LDs) presentes en el citoplasma que participan en la formación de nuevas partículas virales (Samsa, M. et al., 2009; Roby, J. et al., 2015). Además, debido a su estructura en bisagra, la $\alpha 2$, permite al RNA viral mantenerse asociado al resto de la proteína, la cual permanece anclada al ER rugoso (Figura 5) y así interactuar con el resto de las proteínas estructurales durante el ensamblaje flaviviral (Samsa, M. et al., 2009; Oliveir, E., et al., 2016).

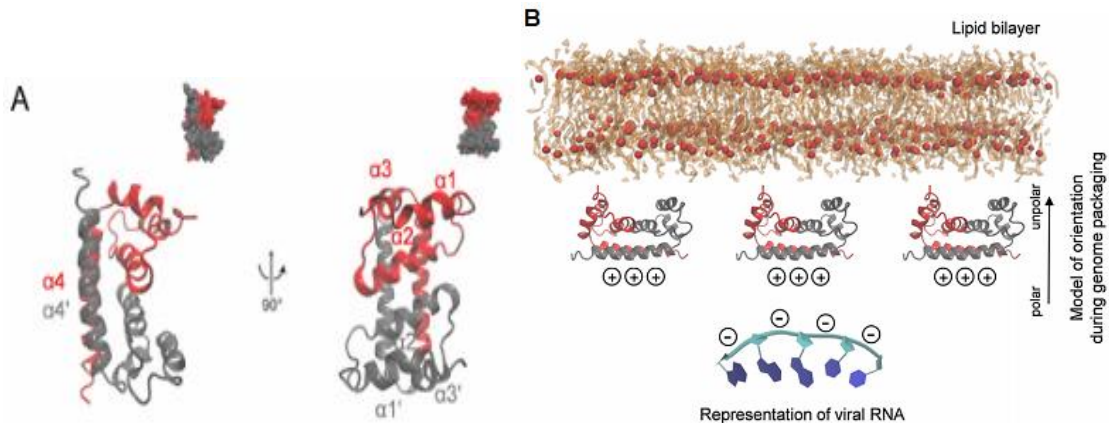


Figura 5. Aspectos estructurales de la proteína C flaviviral. A) Representación esquemática del dímero de cápside. En rojo y gris se distinguen ambas cadenas y se muestran las cuatro alfa hélices de cada monómero. B) Modelo de orientación de la proteína C durante el ensamblaje de la partícula viral, exhibiendo los sitios de interacción con el RNA viral y la bicapa lipídica. (Modificado de Oliveira, E. et al., 2016).

Proteína precursora de membrana (prM) y de membrana (M)

En la mayoría de los *Flavivirus*, la prM es una glicoproteína de aproximadamente 19-21 kDa, que es traslocada al ER por el extremo carboxilo terminal de la proteína C. (Hsieh, S. C, et al., 2014; Cedillo-Barrón, L. et al. 2018). El extremo amino terminal de prM contiene de uno a tres sitios de glicosilación y seis residuos de cisteína conservados. La función principal de prM, es prevenir que la proteína E cambie su conformación a un estado de fusión ante cambios de pH durante la fase de ensamblaje de la partícula viral inmadura (Zhang, Y, et al., 2003; Lindenbach, B. D., 2007; Roby, J. et al., 2015). Durante la maduración de la partícula viral, prM es procesada en los fragmentos pr y M (~10 kDa) por la enzima furina residente del Golgi, permitiendo la liberación del fragmento pr y la homodimerización de las

proteínas E, durante el paso por la vía secretoria (Zhang, Y., et al., 2007a; Yu, I. M, et. al., 2009).

Proteína de envoltura (E)

La proteína E es una glicoproteína asociada a la membrana lipídica que envuelve a los viriones y cuya función principal es la unión a receptor con la subsecuente internalización de la partícula. Sin embargo, debido a su amplia distribución en la superficie de los viriones, es el principal blanco antigénico de la inmunidad humoral (Roby, J. et al., 2015; Stettler, Karin; et. al. 2016). La glicoproteína de envoltura oscila entre los 50-53 kDa, consta de 495 aminoácidos y es una de las proteínas más conservadas entre los *Flavivirus*, ya que la homología entre especies se mantiene alrededor del 40%, y de acuerdo con Sirohi, D. et al. (2016) más del 50% de homología entre DENV y ZIKV (Priyamvada, Lalita; et. al., 2016; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018).

En todos los *Flavivirus*, las glicoproteína E (**Figura 6**) se encuentran organizadas en homodímeros que se distribuyen paralelamente con la envoltura del virión. Cada monómero consiste de tres dominios, DI, DII y DIII, que son subunidades ricas en hojas β plegadas, una región transmembranal y una región de tallo (Lindenbach B.D, et al., 2007; Fhang, X. et. al., 2015). El dominio estructural central, DI, forma una estructura de barril β que sirve de anclaje para los dominios I y III, el extremo amino terminal actúa como anclaje para el dominio II (Zhang, Y. et al., 2004; Mukhopadhyay et al. 2005). El dominio II, contiene una secuencia altamente conservada conformada por 13 aminoácidos hidrofóbicos, el péptido fusogénico, responsable de la fusión de membranas. El dominio III, mantiene una configuración tipo inmunoglobulina, que forma protuberancias en la superficie de la partícula viral (Modis Y. et. al, 2004; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018).

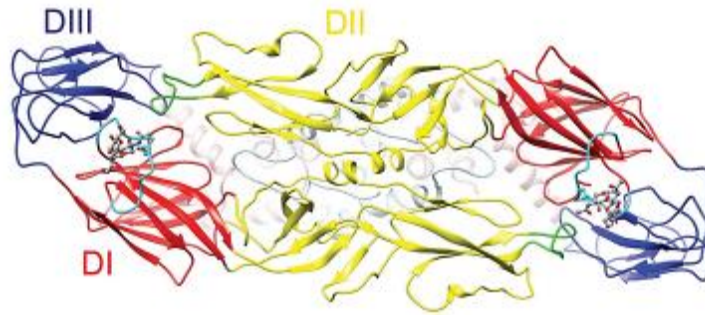


Figura 6. Estructura de la proteína E de *Flavivirus*. Homodímeros de proteína E de tipo cabeza-cola. Los dominios I en rojo, dominios II en amarillo, dominios III en azul. El péptido fusogénico se muestra en color verde. Se observan los sitios glicosilados entre los dominios I y III (Modificado de Sirohi, D., et. al., 2016).

2.1.1.1.2. *Proteínas no estructurales*

Las proteínas no estructurales (NS) tienen un papel importante durante la replicación viral, ya que forman el Complejo Replicativo (RC) y algunas de ellas se ven involucradas durante la evasión de la respuesta inmune innata.

Proteína NS1

La proteína NS1 es una de las proteínas no estructurales que comparte un alto grado de homología entre *Flavivirus* (Muller, D. A., & Young, P. R., 2013). NS1 tiene un peso molecular que varía entre 46 a 55 kDa dependiendo de su estado de glicosilación, existiendo en tres conformaciones oligoméricas distintas: como dímero asociado a la membrana (Mns1), como monómero en compartimientos vesiculares del ER, y secretado al espacio extracelular como hexámero (sNS1) (Velandia, M., 2011; Fan, J. et. al.; 2014). Tanto la sNS1 como la Mns1, pueden estimular al sistema inmunitario induciendo lisis por complemento dependiente de anticuerpos, tanto en células infectadas como no infectadas (Rastogi, M., et al., 2016), lo que la convierte en uno de los blancos antígenicos más importantes durante la etapa aguda de la enfermedad (Lindenbach, B. D., 2007). Además, mutaciones en residuos de glicosilación de NS1 se asocian a defectos en el RNA y la producción de viriones, lo que sugiere su participación dentro de la replicación del genoma viral (Crabtree M. et. al. 2005).

Proteína NS2

NS2 es una proteína que contiene dominios transmembranales (TMDs) en su región amino terminal, que al ser procesada da lugar a dos proteínas, NS2A y NS2B. La proteólisis de NS2 se debe a la acción de proteasas celulares en su extremo amino terminal (que separa a NS2A de NS1) y de la proteasa viral NS2B/NS3 en su extremo carboxilo terminal que separa a NS2A de NS2B (Lindenbach, B. D., 2007; Dentzer, Thomas G. et al., 2009; Zou, J. et al., 2015). La NS2A es una proteína hidrofóbica transmembranal de alrededor de 22 a 25 kDa, cuya función es crucial durante la replicación del RNA mediante la interacción con el extremo 3'UTR y otros componentes del Complejo replicativo (RC), se encuentra asociada con formas replicativas de RNA, dsRNA, y debido a su acción tipo porina, es coadyuvante en el transporte de ssRNA(+) a los sitios de ensamblaje a través de las invaginaciones membranales del ER rugoso inducidas por el resto de las NS (Mackenzie JM; et. al, 1998; Shrivastava G. et. al., 2017). Por otra parte la NSB2 de 14 kDa, posee un dominio hidrofílico central que se une al dominio proteasa de la NS3 y dos dominios terminales hidrofóbicos responsables del anclaje de complejo NS2B/NS3 a las invaginaciones generadas en la membrana del ER. La función principal de NS2B es actuar como cofactor para activar la actividad proteasa de la NS3 (Lindenbach, B. D., 2007; Bollati, M. et al., 2010; Choksupmanee O., et. al., 2012).

Proteína NS3

Considerada una de las proteínas no estructurales más grandes con peso molecular de aproximadamente 70kDa, la NS3 es una proteína que posee actividades enzimáticas involucradas en el procesamiento de la poliproteína y la replicación de RNA (Lindenbach, B. D., 2007; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018). En su extremo N-terminal posee el dominio catalítico NS3pro, altamente dependiente del cofactor NS2B, lo que le permite adquirir actividad de serina-proteasa con sitios de reconocimiento en las divisiones NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/ NS5 de la poliproteína (Bollati, M. et al., 2010). En el extremo C-terminal posee un dominio con tres subdominios, los dos primeros actúan uniéndose al RNA lo que estimula su actividad de trifosfatasa de nucleótidos (NTPasa). El

tercer subdominio actúa como helicasa del RNA (NS3Hel), así como mediador de la interacción con NS5, actividades esenciales durante la replicación del genoma viral (Bollati, M. et al., 2010; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018). Además se ha observado que NS3, mediante el subdominio de helicasa, participa en los procesos de ensamblaje y transporte intracelular de las partículas virales (Patkar C., et. al., 2008).

Proteína NS4

Las proteínas NS4A y NS4B, derivadas del procesamiento de NS4, son proteínas hidrofóbicas de 16 y 27kDa, respectivamente. NS4A se asocia con las invaginaciones presentes en membranas del ER, colocaliza con la estructura de dsRNA generada durante la replicación del genoma viral así como con NS1, NS2A y NS5 promoviendo la correcta distribución en los RCs durante la replicación viral e induce autofagia para prevenir la muerte celular (Zou, J. et. al., 2015; Liang Q. et. al, 2016). En algunos *Flavivirus*, las funciones de NS4A que intervienen con el rearrreglo membranal del ER son reguladas por el fragmento 2K, un péptido señal conservado de 23 aminoácidos, (Lindenbach, B. D., 2007; Zou, J. et. al., 2015; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018). Por otro lado, la NS4B, presenta cinco TMDs que participan durante el correcto anclaje a las membranas lipídicas durante la formación del RC, interactúa con NS3pro para su disociación de las moléculas de ssRNA y más importante, para promover la inhibición de las señales de la respuesta inmunológica innata antiviral por los IFN-1 a nivel de síntesis (Zou, J. et. al., 2015).

Proteína NS5

Finalmente, además de ser la proteína más conservada entre *Flavivirus*, la NS5, es la proteína viral más grande con alrededor de 100 a 103kDa (Lindenbach, B. D., 2007). En su extremo N-terminal posee un dominio con actividad enzimática de metiltransferasa (MTasa), conformado por tres subdominios con sitios principales de unión específicos a sus funciones: un sitio de unión a GTP y RNA y un sitio de unión de S-Adenosil metionina (SAM). Por ende, el extremo N-terminal presenta dos funciones: de MTasa responsable de formar y unir el cap al extremo 5' de las moléculas nuevas de RNA viral mediante metilación y una función

de guanililtrasferasa (Lindenbach, B. D., 2007; Bollati, M. et. al., 2010; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018). Por otra parte, en el extremo C-terminal, se ubica el dominio de polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp), la porción más conservada de la NS5 entre los *Flavivirus*, además de que es capaz de iniciar la síntesis del intermediario replicativo de ssRNA(-) sin el uso de iniciador (Lindenbach, B. D., 2007; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018).

A pesar de que sus funciones se lleven a cabo en los sitios de síntesis de RNA, la NS5 se ha identificado en su forma fosforilada dentro del núcleo, debido a la unión con importina β 1 e importina α/β mediada por la interacción con NS3 en el núcleo, sin embargo su función dentro del núcleo se desconoce (Lindenbach, B. D., 2007; Velandia, M., 2011; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018). Se ha observado que NS5 tiene actividad evasora de la respuesta inmunológica innata, como el bloqueo indirecto de la actividad de IFN-1 e IFN- γ al unirse a sus receptores y bloqueando la señalización para la activación de STAT1 (Lindenbach, B. D., 2007; Zou, J. et. al., 2015; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018).

2.1.2. Ciclo de replicación de los *Flavivirus*

Entrada, fusión y liberación de RNA viral

Inicialmente, las partículas virales se unen a la superficie de células susceptibles, dentro de las que se incluyen: células endoteliales, fibroblastos dérmicos, monocitos, células de Langerhans, neuronas, células de Hofbauer, trofoblastos, células testiculares, fibroblastos uterinos, células asociadas a ojo, entre otras (Neufeldt, C., 2018), lo cual determina el tropismo de los *Flavivirus*. La asociación inicial entre la partícula viral y la célula susceptible, ocurre mediante la interacción de la proteína de envoltura, específicamente por los residuos glicosilados que se encuentran en el dominio III (Tassaneeritthep B.,2003), con factores de adhesión (**Figura 7**), que son esenciales para anclar el virión a la superficie celular. Además, esta unión se fortalece mediante interacciones específicas con receptores secundarios de alta afinidad (Neufeldt, C., 2018). Algunos de los factores y receptores que han sido identificados son: el receptor del antígeno CD209 lectina tipo C (DC-SIGN) (utilizado ampliamente por los cuatro serotipos de DENV en DCs (Tassaneeritthep B.,2003; Mukhopadhyay t al. 2005), receptores de manosa (receptor de DENV en macrófagos), proteoglicano heparán sulfato (HSPG) y glucosaminoglucanos (como co-receptores de baja afinidad que permiten a los

viriones interactuar con diversos tipos celulares (Martínez-Barragán, J. et. al., 2001; Germi, R. et. al., 2002) y miembros de las familias de receptores de fosfatidilserina TIM y TAM (facilitan la entrada de DENV en células epiteliales y de ZIKV en células de placenta, fibroblastos dérmicos y células gliales) (Neufeldt, C., 2018).

La unión del virión a la superficie celular (**Figura 7**), activa los mecanismos de endocitosis mediada por receptor, primordialmente por la vía de entrada dependiente de clatrina (Neufeldt, C., 2018). En el endosoma temprano, el descenso de pH, provoca un cambio conformacional en el dominio II de la glicoproteína E (White, J.M. & Whittaker, G. R., 2016). La acidificación, promueve la generación de un trímero que expone el péptido fusogénico, el cual se inserta en la membrana endosomal y después vuelve a doblarse, provocando la unión de membranas y la consecuente fusión, lo cual permite la liberación del RNA viral en el citoplasma (Li Y., 2014; Gerold, G, et al, 2015). Una vez liberado el ssRNA(+), es reconocido como mRNA por los ribosomas, lo que le permite su traducción en el ER rugoso en una sola poliproteína que es procesada co- y postraduccionalmente por la proteasa NS3-NS2B y proteasas celulares para generar las tres proteínas estructurales y siete no estructurales (Velandia, M., 2011; Roby, J. et al., 2015; Neufeldt, C., 2018).

Cabe destacar, que durante las infecciones por *Flavivirus* se producen anticuerpos neutralizantes dirigidos contra diversos antígenos de la proteína E y prM, evitando algunas fases del ciclo replicativo y su destrucción. Sin embargo, la presencia de anticuerpos no neutralizantes o sub-neutralizantes, promueve la opsonización, endocitosis y/o fagocitosis de las partículas virales por células que expresan receptores de Fc, facilitando la entrada del virus a estas células y la consecuente replicación, incrementando la viremia y la liberación exacerbada de citocinas; este fenómeno es conocido como facilitamiento mediado por anticuerpos (ADE) (Guzman, M. et. al., 2016; Stettler, K., et. al. 2016, Martín-Acebes, M. et. al., 2018).

Replicación del RNA viral

Durante el ciclo de replicación, inicia el proceso de replicación con la síntesis del intermediario de ssRNA con polaridad negativa (ssRNA (-)), que sirve como molde para la síntesis de más moléculas de ssRNA(+) (Velandia, M., 2011). El proceso de replicación

ocurre en asociación con invaginaciones inducidas por las proteínas no estructurales en el ER rugoso, estructuras que se asemejan a organelos conocidos como paquetes vesiculares (VPs) u organelos de replicación (ROs). Los VPs, además de resguardar al RNA viral de receptores de PAMPs virales citoplasmáticos, fungen como sitios de reclutamiento de factores celulares y virales donde son coordinados para su compartimentalización durante la síntesis de nuevos genomas virales, siendo las proteínas no estructurales las responsables de formar al complejo replicativo (RC) (Welsch S. et. al., 2009; Neufeldt, C., 2018). Dentro del RC, la polimerasa NS5 genera el nuevo material genético, que se somete al capping del extremo 5' y metilación, caracterizándose por ser una replicación semi-conservada y asimétrica (Mukhopadhyay t al. 2005; Lindenbach B.D, et al., 2007; Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018).

Ensamblaje, maduración y liberación de viriones

Las nuevas moléculas de ssRNA(+) interactúan con unidades de proteína C que se encuentran asociadas a la membrana del ER rugoso, para permitir el ensamblaje de la nucleocápside (Samsa, M. et. al., 2009). Posterior a la encapsidación del genoma viral, ocurre la unión de la nucleocápside al lumen del ER rugoso en los sitios opuestos a las regiones de replicación, donde se asocian las proteínas prM y E, que generan protuberancias triméricas con aspecto rugoso característico de las partículas virales inmaduras (Lindenbach B.D, et al., 2007; Velandia, M., 2011). Las partículas virales son transportadas por tráfico vesicular a través del aparato de Golgi donde maduran gracias a procesos de glicosilación. Durante el paso a través de las regiones *cis* y *trans*-Golgi, se produce un descenso de pH que produce un rearrreglo conformacional de los heterodímeros prM-E y la consecuente proteólisis de prM por la furina (Velandia, M., 2011; Apte-Sengupta, S. et. al., 2014; Roby, J. et al., 2015). Al ser liberado *pr*, ocurre un cambio conformacional y rotacional de la proteína E que le permite generar homodímeros, proporcionando una apariencia “lisa” a la superficie del virus. Finalmente, los homodímeros E y M se estabilizan y los viriones maduros son secretados por exocitosis (**Figura 7**) (Velandia, M., 2011; Roby, J. et al., 2015).

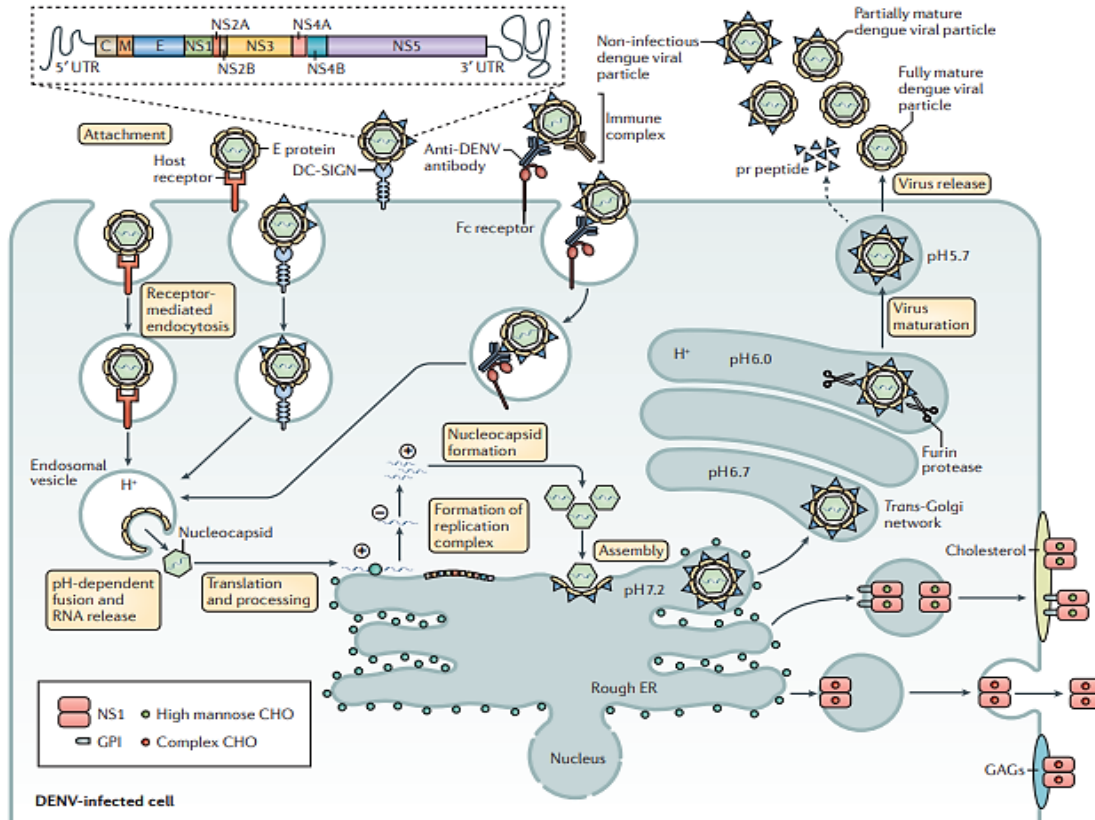


Figura 7. Ciclo replicativo de DENV. Se observa la unión a receptores, endocitosis mediada por la vía dependiente de clatrina, la fusión de las membranas, la traducción del RNA viral, replicación de RNA, el ensamblaje de partículas inmaduros, la maduración del virión durante su paso a través del tran-Golgi y la secreción (Guzman, M. et. al., 2016).

2.2 Variabilidad genética de *Flavivirus*

Durante la replicación del RNA viral, se producen mutaciones que dan lugar a la generación de nuevas variantes o “cuasiespecies virales” de *Flavivirus* en una población. Las mutaciones producen una diversa cantidad de variantes genéticas, cuya variación depende de la cantidad de mutaciones puntuales durante de los ciclos de replicación (Selisko, B. et. al., 2018). Se ha descrito que la generación de cuasiespecies virales o “nubes de mutantes”, depende de la fidelidad de la replicación del RNA viral, la cual es calculada por el número de mutaciones introducidas por una cantidad específica de nucleótidos, durante los ciclos de replicación. Esta frecuencia de mutaciones se produce debido a la adición de pares de bases incorrectos por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) durante la replicación del genoma viral. Las mutaciones producidas por *Flavivirus* se deben a la baja fidelidad de su

RdRp, la proteína NS5, cuya tasa de mutación es de 1/34,000 por UTP, 1/59,000 por ATP y 1/135,000 por CTP (Selisko, B. et al. 2018). Además de sintetizarse copias del RNA viral, debe de generarse una cantidad definida de mutaciones en el genoma, con el fin de proporcionar al virus la capacidad de adaptarse a las presiones evolutivas y cambios en las condiciones ambientales presentes en los hospederos, esta capacidad se conoce como “*fitness*”. Por lo tanto, las variantes genéticas seleccionadas que presenten mejor *fitness* ante la respuesta inmunológica, la variabilidad genética del hospedero, la afinidad al vector, entre otros factores, serán capaces de producir infecciones productivas y permanecer en las poblaciones (Guzman, M. et. al., 2016; Filomatori, C. et al, 2017).

2.3 Virus del dengue y virus del Zika

El virus del dengue (DENV) y el virus del Zika (ZIKV), son arbovirus del género *Flavivirus* que han adquirido importancia a nivel mundial en décadas recientes, debido a los graves problemas de salud que provocan en poblaciones residentes de zonas tropicales y subtropicales, ya que la movilidad, sobrepoblación y la invasión de los ecosistemas endémicos, han estimulado su re-emergencia poniendo a la mitad de la población en riesgo. Se ha reportado que ambos virus son transmitidos por mosquitos hembra hematófagos del género *Aedes spp.*, siendo la especie *Aedes aegypti* la más relevante en ciclos urbanos seguida de *Aedes albopictus*, lo cual permite la co-circulación de los virus (WHO, 2018; WHO, 2019).

2.3.1 Virus del dengue (DENV)

El virus del dengue, fue descubierto en 1907 durante epidemias en las Filipinas y Tailandia, sin embargo existen datos que se remontan a la década de 1770s, donde se describen los síntomas clínicos de DENV como “breakheart fever” por Benjamin Rush (Rush, B., 1789; Halstead, s.f.; Gerold, G. et. al., 2017). Existen cuatro serotipos antigénicamente distintos, pero estrechamente relacionados de DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, que exhiben del 65 al 70% de homología en su secuencia (Murrell, S. et al., 2010), sin embargo en octubre de 2013, un quinto serotipo (DENV-5) fue identificado, el cual fue aislado de un paciente de 37 años en Malaysia en 2007 (Mustafa, M.S., et. al.,

2014). DENV-5 es un serotipo presente en ciclos selváticos y aunque se asemeja a DENV-4, se ha observado que constituye un grupo único y filogenéticamente distinto, por lo que su descubrimiento requiere investigación rigurosa y exhaustiva (Cegolon, L. et. al., 2018).

Los cuatro serotipos de DENV causan las mismas manifestaciones clínicas que pueden variar en severidad, mostrando patrones similares de diseminación sistémica, con tropismo principal por monocitos, macrófagos y células dendríticas (Rothman, A., 2011). DENV mantiene la estructura general del género *Flavivirus*; viriones envueltos de aproximadamente 50 nm, con cápside icosaédrica que encapsula una molécula de ssRNA(+) de 10.7 kb con un solo marco de lectura abierto, que codifica para las tres proteínas estructurales y siete no estructurales.

2.3.2 Virus del Zika (ZIKV)

El virus del Zika es un arbovirus que fue identificado por primera vez en 1947 en un macaco Rhesus en los bosques Zika, Uganda y posteriormente en 1952 en humanos en la República Unida de Tanzania y Uganda. Se ha diseminado a través de África, Asia y en 2015, se reportó un gran brote en el continente Americano, siendo Brasil el primer país afectado (WHO, 2018; Carpio-Orantes, L., s.f). Existen tres linajes genéticos de ZIKV: el linaje de África Occidental, de África Oriental y el linaje Asiático, todos pertenecientes a un mismo serotipo (Calvez, E. et. al., 2018; Dowd, K.; et. al., 2016; Carpio-Orantes, L., s.f). Al igual que DENV, ZIKV es un *Flavivirus* envuelto de aproximadamente 50nm, cuyo genoma se encuentra constituido por una molécula de RNA de cadena sencilla de 10.8 kb. Estructuralmente, ZIKV difiere de otros *Flavivirus* por el número de aminoácidos y glicosilaciones que conforman a la proteína C y E (Sirohi, D. & Kuhn, R., 2017). Además, se ha observado que a diferencia de otros *Flavivirus*, ZIKV es capaz de atravesar la barrera placentaria causando defectos fetales, debido al tropismo por células placentarias como trofoblastos, incluyendo también células del sistema nervioso central y periférico, de la retina y nervio óptico, células testiculares, entre otras; este tropismo gobierna la naturaleza de la patología desarrollada por ZIKV (Sirohi, D. & Kuhn, R., 2017).

2.4 Presentaciones clínicas e historia natural de las enfermedades causadas por DENV y ZIKV

La transmisión horizontal de DENV y ZIKV por mosquitos *Aedes aegypti*, representa la transmisión más común de estos *Flavivirus* hacia hospederos humanos residentes de zonas endémicas, debido a la alta distribución del vector (Powell, J. et. al., 2018). El ciclo de transmisión (Figura 8) inicia cuando mosquitos hembra se infectan al alimentarse de sangre de un humano infectado en la fase de viremia. Durante la fase de incubación, el *Flavivirus* infecta células del intestino medio y posteriormente se disemina a otros tejidos del vector hasta llegar a las glándulas salivales, momento en el cual el mosquito es capaz de transmitir el virus a otro hospedero humano durante su alimentación, manteniendo capacidad infectiva durante toda su vida (1-2 \geq semanas) y concluyendo el ciclo de infección (Guzman, M. et. al., 2016).

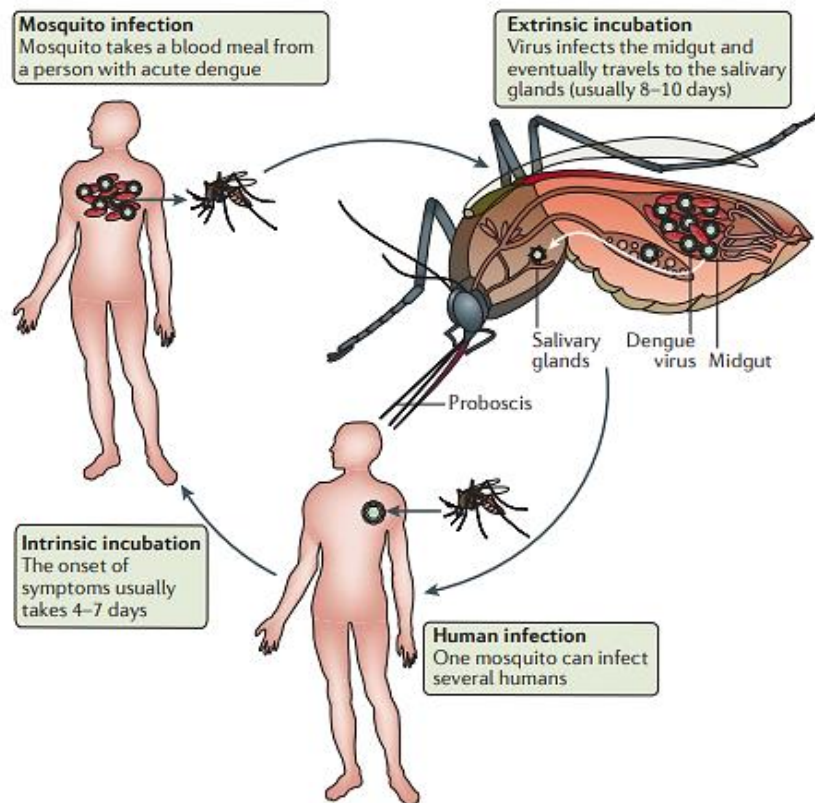


Figura 8. Ciclo de transmisión de DENV en humanos y mosquitos, representativo de la transmisión horizontal de *Flavivirus* (Guzman, M. et. al., 2016).

2.4.1 Presentación clínica DENV

Los cuatro serotipos de DENV (DENV-1/2/3/4), pueden producir infecciones que cursan asintómicamente, pero en ocasiones son agentes causales de una enfermedad severa, que se caracteriza por presentar fiebre alta (40°C) y que está acompañada de signos y síntomas como: dolor de cabeza intenso, dolor retro-ocular, dolor muscular y articular, náusea, vómito, inflamación de ganglios linfáticos o salpullido. Las manifestaciones clínicas se presentan al cabo de un periodo de incubación de 4 a 10 días después de la picadura del mosquito infectado y usualmente duran entre 2 y 7 días (WHO, 2019).

Anteriormente, la enfermedad por dengue se clasificaba en: fiebre por dengue (DF), fiebre hemorrágica por dengue (DHF) y síndrome de choque por dengue (DSS) (Murrell, S. et al., 2010), cuya severidad variaba independientemente del serotipo de DENV asociado. Fried J.R y colaboradores (2010), analizaron datos recolectados en Tailandia, encontrando que existía una asociación entre DHF subsecuente a una infección secundaria; los casos severos de dengue se presentaban en infecciones con DENV-2, y DHF era más común en infecciones secundarias por DENV-2 y DENV-3, sin embargo estos datos únicamente representaron a una zona geográfica específica y no se encontró asociación entre la presentación clínica y un serotipo específico (Murrell, S. et al., 2010). Estos hallazgos resaltan un factor clave durante las infecciones secundarias por serotipos heterólogos de DENV, donde la participación de anticuerpos no neutralizantes desarrollados durante una primo-infección, son atribuidos al desarrollo de las presentaciones más severas de la enfermedad, fenómeno conocido como facilitamiento mediado por anticuerpos (ADE) (Murrell, S. et al., 2010; Rothman, Alan L., 2011), donde además de presentarse signos y síntomas característicos de enfermedad por dengue, se observan hemorragias, deterioro de órganos, choque, etc.

Sin embargo, en el año 2009, con el objetivo de facilitar la caracterización de la enfermedad por dengue, la Organización Mundial de la Salud proporcionó una nueva clasificación de los casos de dengue en: dengue no grave con signos de alarma (DCSA) o sin signos de alarma (DSSA) y dengue grave (DG) (OMS, 2009). Los criterios para determinar el tipo de dengue se señalan en la Figura 9.

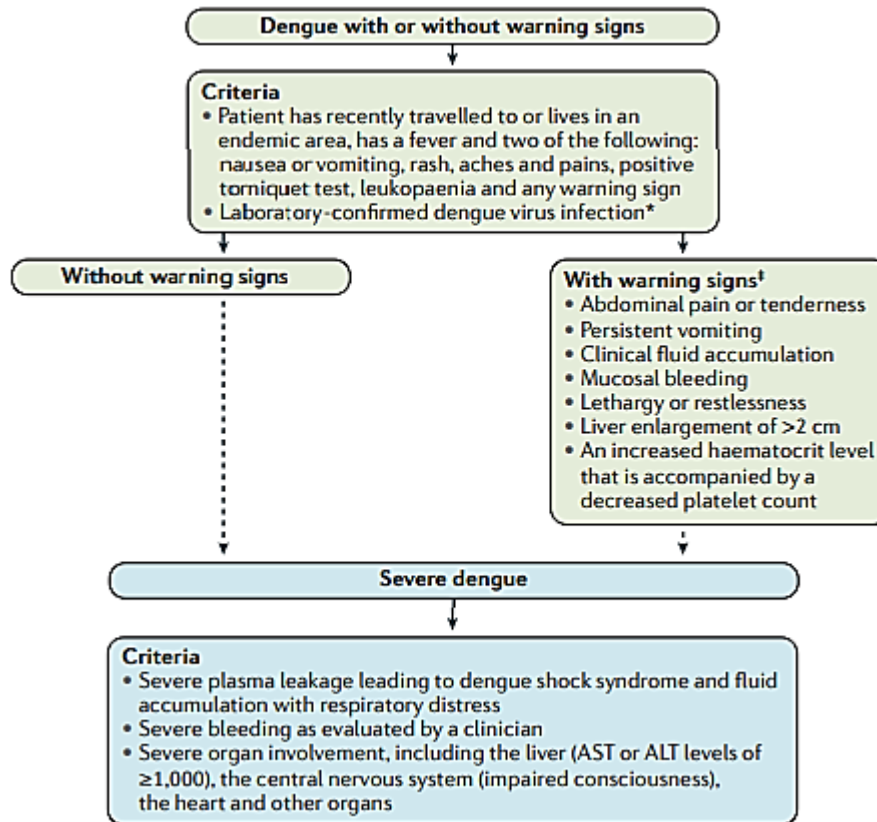


Figura 9. Clasificación clínica de dengue de acuerdo a las guía emitidas por la OMS 2009 (Guzman, M. et. al., 2016).

Durante el curso de la enfermedad, se pueden distinguir tres fases de evolución: la fase aguda, la fase crítica y la fase de recuperación (**Figura 10**). La fase aguda ocurre dentro de un periodo de 2 a 6 días, etapa en la que se presenta viremia en circulación sanguínea, se presentan las primeras manifestaciones de la enfermedad con intensidad variable y hay presencia de NS1 en circulación. Durante esta etapa se recomienda el aislamiento viral y la tipificación por RT-PCR. Posteriormente, la fase crítica se caracteriza por la evolución de la enfermedad a formas severas (extravasación de plasma, hemorragias, hipotensión, choque), la disminución de NS1 en circulación, no se detecta viremia y comienzan a elevarse los títulos de IgM, proceso que dura entre 24 y 48 horas. Finalmente, en la fase de recuperación o convalecencia hay mejoría del estado general y se observa un aumento de IgGs y la disminución de IgMs en circulación (Guzman, M. et. al., 2016).

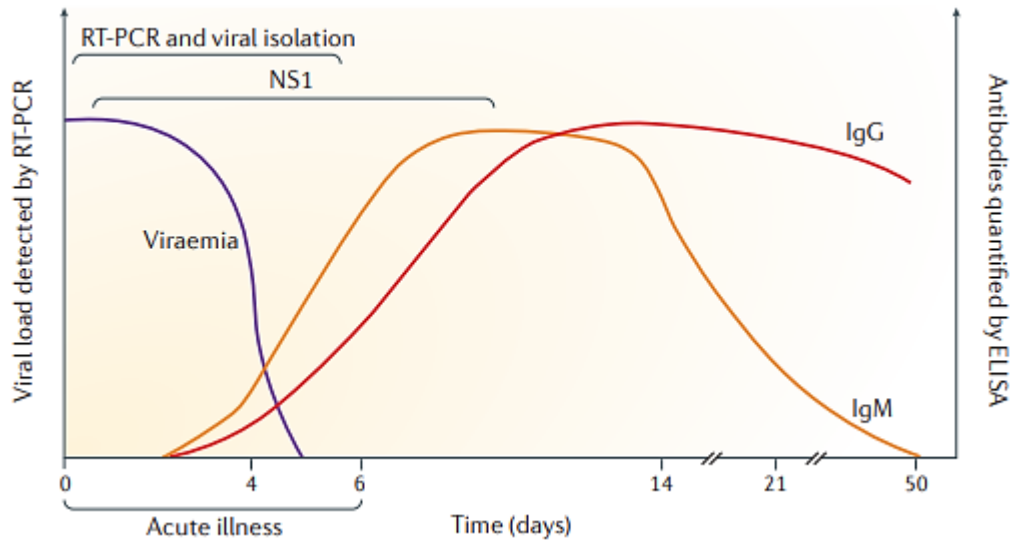


Figura 10. Cambios en la viremia, NS1 en circulación y anticuerpos durante el curso de la enfermedad por dengue. Se señalan los diversos métodos de diagnóstico en cada fase de la enfermedad (Guzman, M. et. al., 2016).

2.4.2 Presentación clínica ZIKV

Durante la infección por ZIKV, se produce una enfermedad de duración aproximada de entre 3 a 14 días y que en la mayoría de los casos es asintomática. Sin embargo, las manifestaciones clínicas que pueden presentarse duran de 2 a 7 días e incluyen signos y síntomas como: fiebre, salpullido, conjuntivitis, mialgia, artralgia, dolor de cabeza y malestar general (WHO, 2019).

La enfermedad por ZIKV ha adquirido gran importancia debido a la divergencia de transmisión que posee con respecto a otros *Flavivirus*, permitiendo la transmisión de humano a humano por contacto sexual, transfusión de sangre, probable transmisión ocular (Miner, J.J.& Diamond, M. S. 2018) y transmisión vertical de la madre al feto (Beaver, J. et al, 2018). Se ha reportado que a pesar de que ZIKV puede detectarse en el semen hasta 9 meses después de iniciada la infección, la transmisión sexual únicamente ocurre dentro de los primeros 20 días y la cantidad de partículas virales en el semen desciende en los primeros 3 meses posteriores a la infección (Mead PS, et al, 2018).

Se ha observado que ZIKV presenta tropismo diverso, lo que correlaciona con el desarrollo de complicaciones severas durante el curso de la enfermedad. La transmisión

vertical se debe al tropismo por células de la placenta humana que le permite al ZIKV el paso a través de la barrera placentaria y el consecuente desarrollo del Síndrome Congénito por Zika (CZS), que se caracteriza por patrones específicos de defectos de nacimiento como: microcefalia severa, desproporción craneofacial, anormalidades oculares, tejido cerebral disminuido, articulaciones con limitaciones en el movimiento y secuelas neurológicas (Moore, C. et al., 2017; CDC, 2019). Por otro lado, el neurotropismo de ZIKV, además de provocar notable deterioro neuronal en el feto, es capaz de infectar células del sistema nervioso central y periférico en adultos, produciendo neuropatías, como el Síndrome de Guillain-Barré (GBS). GBS es una enfermedad autoinmune que se desarrolla por una posible exacerbación del sistema inmune como consecuencia a la infección por ZIKV. Se caracteriza por causar debilidad muscular, parálisis progresiva y en ocasiones la muerte debido a la presencia de autoanticuerpos que atacan gangliosidos de las membranas celulares de las neuronas del sistema nervioso periférico (Barbi, L. et al, 2018).

De acuerdo con la CDC, el diagnóstico para *Flavivirus* debe de constituir pruebas de ELISA que detecten anticuerpos IgM contra la proteína E para identificar ZIKV, y anticuerpos IgG anti-NS1 para DENV. Además, debido a la alta homología estructural que presentan ZIKV y DENV, se recomienda realizar ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT) complementando con RT-PCR Trioplex en tiempo real, para confirmar la especie de *Flavivirus* (CDC, 2019). En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud, la detección de DENV debe de realizarse mediante ELISA de IgG e IgM anti-NS1, inmunocromatografía rápida anti-NS1 y RT-PCR. Las pruebas para ZIKV incluyen RT-PCR en tiempo real y aislamiento a partir de muestras de sangre, antes descartando infección por CHIKV y DENV (Secretaría de Salud, 2015).

2.5 Distribución y epidemiología de *Flavivirus*

La incidencia de infecciones por *Flavivirus* está influenciada por un amplio rango de factores que promueven la presencia de los vectores transmisores, como lo son las temporadas de lluvia, cambios de temperatura, la urbanización espontánea en zonas endémicas y residentes de zonas tropicales y subtropicales. Debido a la adaptación de *A. aegypti*, a la urbanización y la capacidad de *A. albopictus* de sobrevivir a bajas temperaturas,

la distribución de DENV y ZIKV ha incrementado alrededor del mundo en las últimas décadas (WHO, 2019).

Se estima que alrededor de 390 millones de infecciones por DENV ocurren cada año, de las cuales 96 millones se manifiestan con síntomas de severidad variable. El año 2016 se caracterizó por presentar grandes epidemias, de las cuales más de 2.38 millones ocurrieron en el continente americano y a pesar de que en los años 2017-2018 la incidencia disminuyó, se ha observado que los casos de DENV van en rápido aumento durante este 2019 (WHO, 2019). Con respecto a ZIKV, se ha observado que desde su re-emergencia en 2007, 86 países han reportado infecciones asociadas al vector, 48 países del continente americano (PAHO, 2017; WHO, 2019). En el 2015, la OMS reportó asociaciones entre infecciones con ZIKV, la microcefalia congénita y síndrome de Guillain-Barré en Brasil.

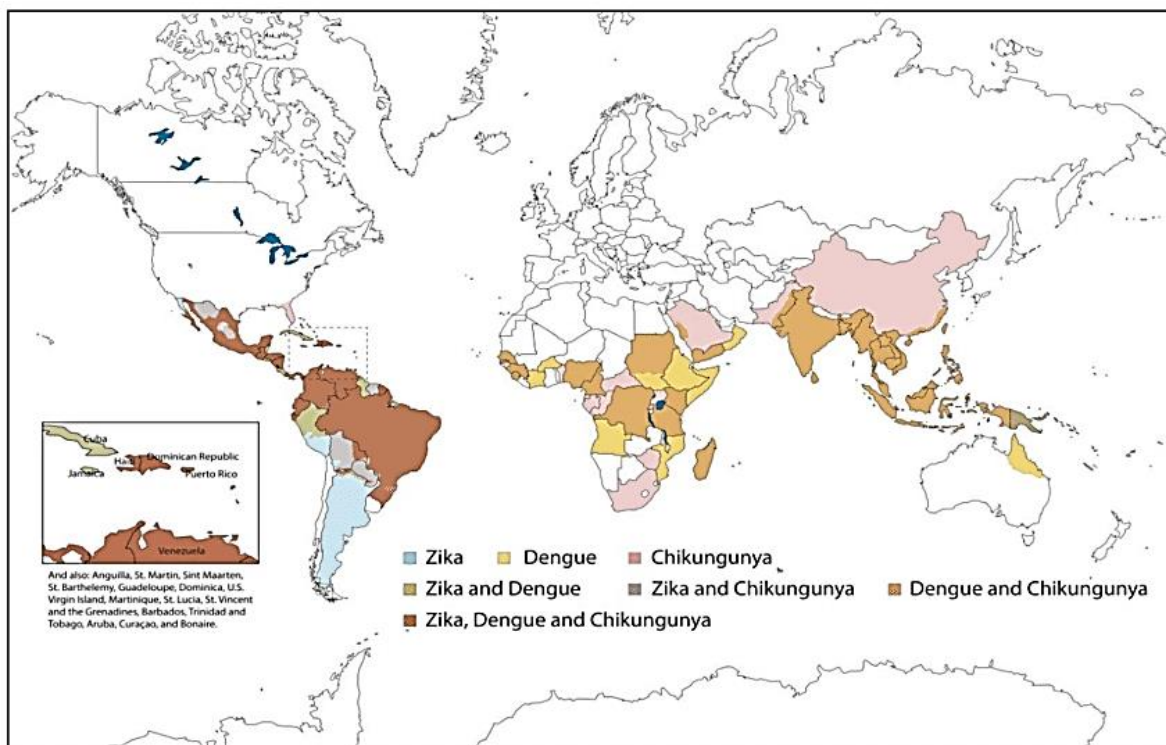


Figura 11. Distribución global de arbovirus transmitidos por los vectores *A. egypti* y *A. albopictus*. Se observa la alta co-circulación de ZIKV y DENV en el continente americano (Patterson, J. et al, 2016).

2.5.1 Epidemiología en México

En el último año la Secretaría de Salud mediante la Dirección General de Epidemiología y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, han reportado 12,706 casos confirmados de DENV en el 2018, de los cuales, 3,619 fueron reportados como DCSA, 858 como DG y 4,477 como DCSA y DG. El 82% de los casos confirmados corresponden a los estados de Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nuevo León y San Luis Potosí. Actualmente, hasta la semana 17 del 2019 se han reportado 975 casos con DNG, 514 con DCSA y 113 con DG. Con respecto a las infecciones por ZIKV, se han confirmado 16 casos hasta el 6 de mayo de 2019 y desde 2015 se han presentado más de 12,000 casos acumulados hasta el 2018, número del cual 58.11% son casos en mujeres embarazadas ([Secretaría de Salud, 2019](#)).

2.6 Respuesta inmunológica innata contra *Flavivirus*

La respuesta inmunológica innata, es la primera línea de defensa que nos protege frente a las infecciones, ya que impide que éstas dañen al organismo mediante su control o eliminación. El sistema inmunológico innato influencia el tipo, intensidad y calidad de la respuesta inmunológica adaptativa, permitiendo que la respuesta inmunológica se fortalezca y así la eliminación de patógenos sea efectiva y permanente. Dos respuestas protectoras principales que caracterizan a la respuesta inmunológica innata contra virus, son la inflamación y la antiviral; la primera permite que leucocitos y otros factores plasmáticos sean reclutados a sitios de infección para controlar y eliminar virus patógenos y la segunda, la respuesta antiviral, previene la replicación viral, mediante la inducción de muerte celular de células infectadas que actúan como reservorios, logrando la contención y la prevención de la diseminación viral ([Abbas, A. et. al., 2018](#)). Sin embargo, muchos microorganismos patógenos han desarrollado estrategias de evasión.

Posterior a la picadura del mosquito infectado, la inoculación de *Flavivirus* en la dermis y epidermis, permite la interacción con las células residentes del sitio de inoculación, como: células endoteliales, fibroblastos, células de Langerhans, mastocitos, macrófagos y linfocitos que se encuentran cerca de la zona de infección ([Bustos-Arriaga, J. et. al. 2015](#)). El virus es capaz de infectar a las células residentes y comenzar su replicación, lo que estimula el inicio

de la respuesta inmunológica innata antiviral. Durante esta etapa, se producen mediadores solubles que establecen un microambiente antiviral en la piel, permitiendo el reclutamiento de leucocitos a la zona primaria de infección para el control y eliminación del virus. Sin embargo, la migración de células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas infectadas, a través de la circulación linfática, permite la diseminación del virus (Murrell, Sarah, et. al., 2010; Bustos-Arriaga, J. et. al. 2015).

La respuesta inicial del sistema inmunológico innato, se debe al reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMPs) por receptores específicos que reconocen dichos patrones (PRRs). La activación de PRRs, activa vías de señalización que permiten la expresión de citocinas que montan el estado antiviral necesario para inhibir la replicación y evitar la diseminación viral, dichas citocinas antivirales son conocidas como interferones de tipo 1 (IFN-1) (Rodenhuis-Zybert, I. et.al., 2010; Abbas, A. et. al., 2018).

2.6.1 Activación de PRRs por reconocimiento de PAMPs virales

Los PAMPs virales están conformados por proteínas, complejos proteína-lípidos, proteína-carbohidratos y material genético que son específicos de cada virus, de su localización en compartimientos celulares y de su acumulación durante el ciclo replicativo (Kell, A. & Gale M., 2015). Con respecto a los *Flavivirus*, los PAMPs más importantes son el RNA viral que se libera en el citoplasma durante la entrada del virus a la célula y los intermediarios de replicación que se generan como el RNA de doble cadena (dsRNA), los cuales son reconocidos por dos grupos principales de PRRs intracelulares: los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores tipo RIG-I (Gen inducible por ácido retinoico) (RLRs) (Suthar, M., et. al; 2013; Kell, A. & Gale M., 2015).

Receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll (TLRs) son glicoproteínas integrales de membrana que contienen repeticiones ricas en leucina que participan en el reconocimiento de los PAMPs y un dominio Toll/receptor para IL-1 (TIR) en su cola citoplasmática (Abbas, A. et. al., 2018). El reconocimiento de los PAMPs flavivirales lo llevan a cabo TLRs expresados en

compartimentos endosomales; el intermediario dsRNA es reconocido por TLR3 y las moléculas de ssRNA por TLR7 y TLR8 (Suthar, M., et. al; 2013). Tras el reconocimiento del material genético flaviviral, ocurre una dimerización de los TLRs que acerca los dominios TIR, lo que induce al reclutamiento de proteínas adaptadoras citoplasmáticas que activan dos vías de señalización diferentes, la vía dependiente del factor TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR inductor de IFN- β) utilizado por TLR3 y la vía dependiente del factor MyD88 utilizado por TLR7 y TLR8 (Lester, S. N., & Li, K., 2014). La activación dependiente de TRIF induce la fosforilación y translocación al núcleo de los factores reguladores de interferón 3 y 7 (IRF3/IRF7), gracias al complejo de cinasas TRIF-TRAF3/TBK1/IKK. Por otro lado, la activación dependiente de MyD88 media la activación de IRF7 y el factor nuclear κ B (NF- κ B) por la actividad de IRAKs-TRAF6-IKK (Figura 12). Ambas vías de activación culminan en la transcripción de los genes, traducción y secreción de interferones de tipo 1 (IFN-1) y citocinas pro-inflamatorias que permiten iniciar el estado antiviral (Cedillo-Barrón, L. et. al. 2018; Guo, Hong-Yan. Et. al., 2018).

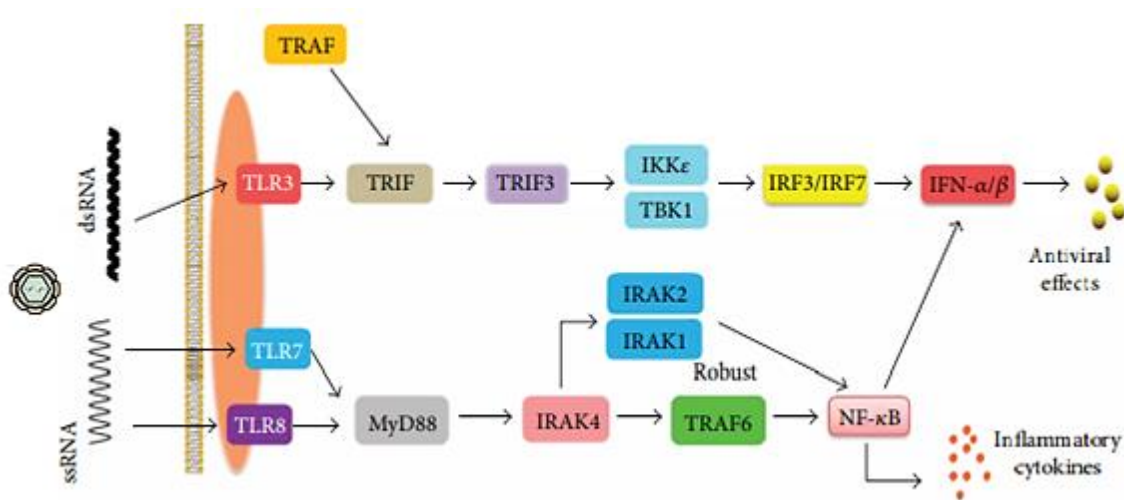


Figura 12. Vías de señalización de TLRs inducidas por el reconocimiento de RNA flaviviral. TLR3 reconoce dsRNA e induce la activación de los factores IRF3/IRF7 por la vía dependiente de TRIF. TLR7/8 reconoce ssRNA e induce la activación de IRF7 y NF- κ B por la vía dependiente de MyD88. Ambas vías conllevan la síntesis de IFN-1 que induce un microambiente antiviral. La vía dependiente de MyD88 induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. (Modificado de Guo, Hong-Yan. Et. al., 2018).

Receptores tipo RIG-I

Los receptores tipo RIG-I (RLRs) son PRRs citosólicos de dsRNA y ssRNA. Dentro de este grupo, los más importantes para el reconocimiento de RNA flaviviral son RIG-I y MDA5 (gen asociado a la diferenciación de melanoma 5) y la molécula LGP2 (Laboratorio de genética y fisiología 2) que actúa como regulador negativo (Cedillo-Barrón, L. et al. 2018). Los RLRs cuentan con un dominio de helicasa de RNA y un dominio C-terminal de reconocimiento de RNA, sin embargo, únicamente RIG-I y MDA5, contienen dominios N-terminales de reclutamiento de caspasas en tándem (CARD) que permiten la transducción de señales, al contrario de LGP2 que carece de dominio CARD por lo cual es incapaz de traducir las señales, fungiendo como regulador negativo de la señal. Posterior al reconocimiento y unión al RNA viral, los RLRs (a excepción de LGP2) son reclutados en la membrana mitocondrial externa por interacción con la proteína ligada a ligasa de ubiquitina E3 25 (TRIM25) permitiendo la asociación con la proteína MAVS (señales antivirales mitocondriales), la cual se oligomeriza y activa TBK-1 e $IKK\alpha/IKK\beta/IKK\epsilon$ mediante fosforilación. Subsecuentemente, IRF3/IRF7 así como de NF- κ B p60 y p65, son activadas, permitiendo su translocación al núcleo y la transcripción de los genes de IFN-1 y citocinas pro-inflamatorias (Goubau, D. et al., 2013; Reis e Sousa, C., 2017; Guo, Hong-Yan. Et. al., 2018) (**Figura 13**). Además, se ha observado que MDA5 y RIG-1 inhiben directamente la replicación flaviviral al bloquear la interacción entre el RNA y proteínas del RC (Suthar, M., et. al; 2013).

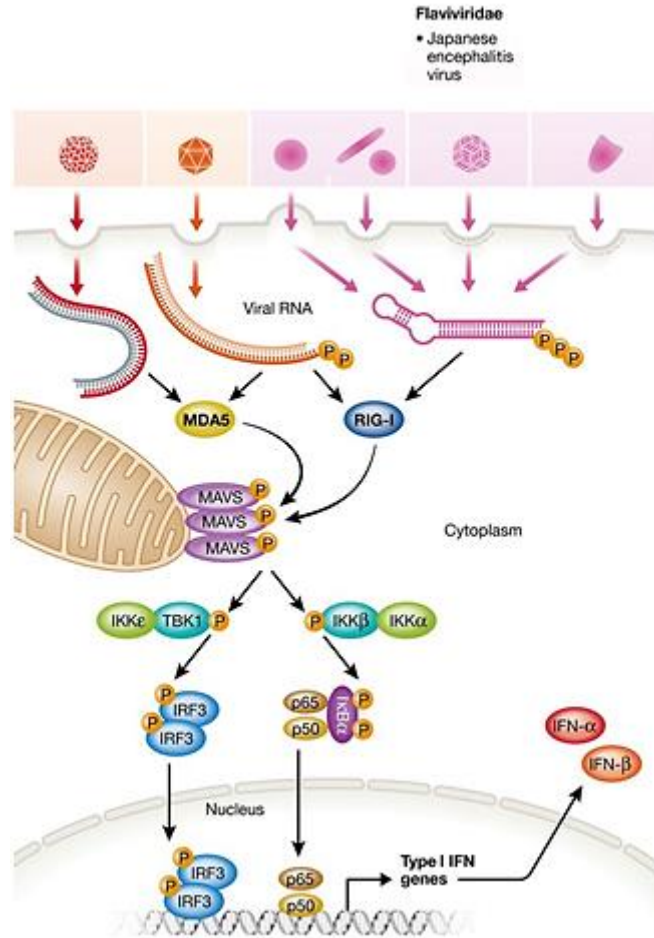


Figura 13. Vía de señalización desencadenada por RLRs en reconocimiento de RNA flaviviral. El reconocimiento de dsRNA flaviviral, en su mayoría por RIG-I, induce su asociación con MAVS, proteína que se oligomeriza y activa TBK-1, IKK $\alpha/\beta/\epsilon$, estos fosforilan a IRF3 y NF- κ B (libera los factores p60 y p50), que se translocan al núcleo y se unen a los sitios consenso en los promotores de los genes de IFN-1 (Modificado de Reis e Sousa, C., 2017).

2.6.2 Interferones de tipo 1

Posterior al reconocimiento del RNA flaviviral por los TLRs y RLRs, las subsecuentes cascadas de señalización convergen en la activación de los factores IRF 3, IRF 7 y NF- κ B que son críticos para la transcripción de las citocinas que establecen el microambiente antiviral en las células infectadas y no infectadas, los interferones de tipo 1 (IFN-1). Los interferones de tipo 1, son una familia de dímeros de polipéptidos de 18 a 20kDa secretados que incluyen a los 14 interferones tipo α (IFN α) y un interferón β (IFN β) (Owen, J., 2014). Sin embargo, esta familia también se encuentra compuesta por IFN ϵ , IFN κ , IFN τ , IFN ω , IFN δ e IFN ζ

(Samarajiwa, S. et. al, 2009). Su transcripción es estimulada cuando, IRF3/IRF7 y NF- κ B son translocados al núcleo y se unen a los sitios consenso en los promotores de genes de IFN-1, activando la transcripción y posterior traducción.

Una vez sintetizados y secretados, los IFN-1 tienen efecto autocrino y paracrino (**Figura 14**) mediante la unión a su receptor transmembranal compartido (IFNAR), el cual está conformado por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2. La activación de IFNAR conlleva a la activación de las proteínas tirosina cinasas asociadas al receptor de la cinasa Janus 1 (JAK 1) y a la tirosina cinasa 2 (TYK2), que fosforilan los residuos tirosina, de dos factores de transcripción citoplasmáticos: el transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) y STAT2. Las formas fosforiladas de STAT1 y STAT2 se dimerizan y se asocian con el factor regulador 9 (IRF9), para formar un complejo trimolecular llamado factor genético 3 estimulado por IFN (ISGF3) (Urosevic, N., 2003; Ivashkiv, L. & Donlin, L., 2014). ISGF3 se transloca al núcleo y se une a elementos o secuencias consenso del DNA denominadas elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) que se encuentran en regiones promotoras de miles de genes estimulados por interferón (ISGs) estimulando su transcripción y consecuente traducción (Ivashkiv, L. & Donlin, L., 2014). Las proteínas codificadas por ISGs tienen diversos mecanismos que inhiben a los *Flavivirus* y otras especies de virus, aunque el mecanismo antiviral de la gran mayoría de los ISGs no ha sido descrito, los descritos a la fecha presentan actividad antiviral a nivel de entrada, desnudamiento, transcripción, traducción, replicación viral, degradación de RNA viral y la alteración del metabolismo lipídico, entre otros. (Urosevic, N., 2003; Ivashkiv, L. & Donlin, L., 2014).

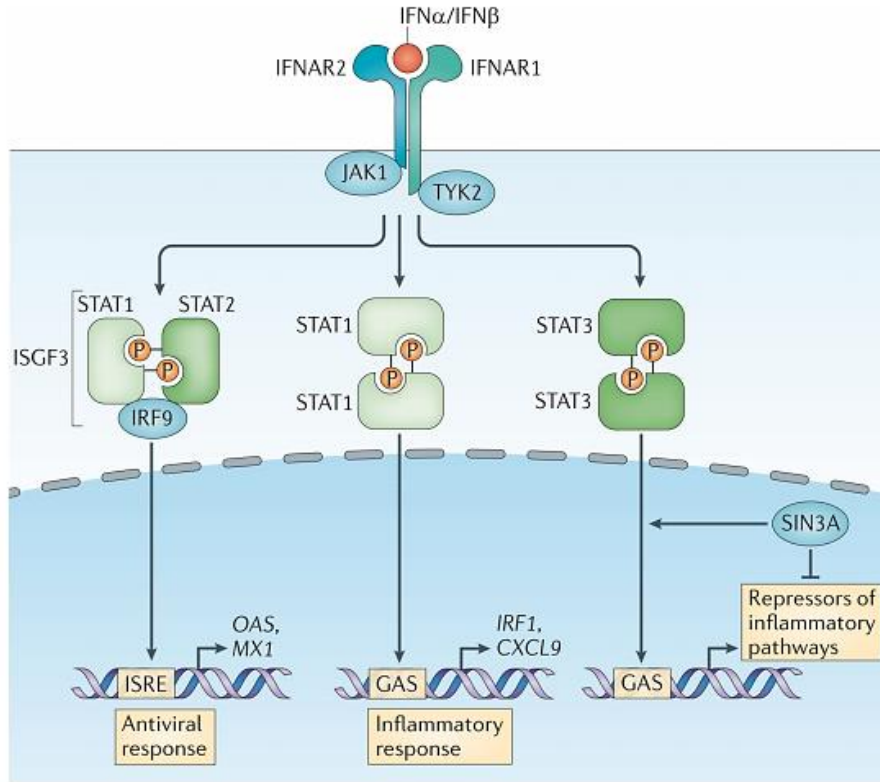


Figura 14. Vía canónica de señalización de interferones de tipo 1. La unión de IFN-1 a IFNAR permite la consecuente activación de la cinasas JAK1/TYK2 que fosforilan al receptor y reclutan a STAT1 y STAT2. STAT1/STAT2 son fosforilados en sus residuos de tirosina y se dimerizan para unirse a IRF9, formando al complejo trimérico, ISGF3. ISGF3, se transloca al núcleo y se une a las secuencias ISRE en sitios promotores de ISGs, lo que permite la expresión de citocinas e ISGs. La vía más importante durante infecciones por *Flavivirus* es aquella donde la participación de ISGF3 está presente (Ivashkiv, L. & Donlin, L., 2014).

2.6.3 Genes estimulados por interferón

El objetivo principal de la traducción de ISGs, se basa en la expresión de efectores moleculares antivirales o moléculas con el potencial de regular las señales de IFN-1. Los mecanismos generales de los ISGs se enfocan en modular la integridad de los ácidos nucleicos virales, bloquear el ciclo replicativo a nivel de la entrada, fusión de membranas, traducción proteica, replicación, ensamblaje y secreción de partículas virales, entre otros (Schoggins, J.W., 2014). Además, las señales de IFN-1 promueven un aumento en la síntesis de receptores RIG-I y MDA5, moléculas STAT1/2, cinasas TBK, IKKs, microRNAs, entre otras moléculas ISGs, que promueven el incremento de las señales por IFN-1 y la consecuente expresión de una mayor variedad de ISGs (Ivashkiv, L. & Donlin, L., 2014).

Algunos ejemplos de las proteínas codificadas por ISGs de las que se ha descrito su mecanismo antiviral, se encuentra la proteína p87 de resistencia al mixoma 1 (Mx1), una GTPasa que inhibe la entrada de partículas virales durante la endocitosis e interacciona con las nucleocápsides, antes del inicio de la replicación viral de WNV (Schoggins. J.W., 2014). Se ha observado que las familias IFIT (proteínas inducidas por IFN con repeticiones tetratricopeptídicas) e IFITM (proteínas transmembranales inducidas por IFN), tienen impacto sobre el ciclo replicativo de WNV, ya que inhiben la entrada de los viriones y la fusión de membranas, la traducción de la poliproteína y promueven el reconocimiento de RNA viral para su degradación (Diamond & Farzan, 2013). La proteína cinasa activada por dsRNA (PKR) inhibe la traducción de mRNA o ssRNA(+) en el caso de WNV, reportándose que el efecto que tiene PKR sobre el bloqueo de la síntesis de las proteínas virales de WNV, esta mediada por dicho mecanismo (Samuel, M.A, et al., 2006). Se ha observado que los miembros de la familia de enzimas OAS (2'-5' oligoadenilato sintetasa) se encargan de la degradación del RNA flaviviral de JEV por activación de RNAsas celulares y se sugiere que algunas isoformas de estas enzimas, contribuyen a la defensa contra infecciones por DENV (Zheng, S. et. al., 2016; Schoggins. J.W., 2014).

Por otra parte, otra proteína importante codificada por ISGs, la viperina, ha demostrado estar involucrada en las vías de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, que promueven la disminución de la viremia y la disminución de replicación de WNV en tejidos neuronales (Szretter KJ, et al., 2011). En adición, se ha reportado que el dominio C-terminal de la viperina tiene la capacidad de interactuar con proteínas no estructurales como la NS3 de DENV-2, inhibiendo su función enzimática (Helbig, KJ., et. al., 2013). Por último, se ha demostrado que el gen 15 estimulado por IFN (ISG15), una molécula tipo ubiquitina, tiene la capacidad de modificar un gran número de proteínas antivirales, incluyendo: RIG-1, IRF3, MDA-5, MX1, PKR, STAT 1 y JAK1, potenciando su función durante infecciones por WNV y DENV, previniendo que estos virus modifiquen a dichas proteínas y no logren inducir su degradación (Dai, J. et. al. 2011; Schoggins. J.W., 2014).

2.7 Mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica innata por *Flavivirus*

Muchos virus han desarrollado estrategias para escapar los efectos antivirales inducidos por IFN-1, proporcionándoles la capacidad de tomar control sobre la maquinaria celular para

establecer infecciones productivas, y se ha observado que los *Flavivirus* no son la excepción. Existen diversos mecanismos por los cuales los *Flavivirus* son capaces de modular la respuesta de IFN-1 con acción a diferentes niveles, dentro de lo que se incluye: el bloqueo a nivel de reconocimiento por los PRRs, el bloqueo de las cascadas de señalización para la activación de los factores estimuladores de la producción de IFN-1, antagonismo de las funciones antivirales de IFN-1, entre muchos otros (Muñoz- Jordán, J.L, 2010).

Los diversos mecanismos por los cuales los *Flavivirus* montan respuestas de evasión, varían considerablemente de acuerdo a las mutaciones que benefician su adaptación a las presiones a las que son sometidos (Filomatori, C. V. et al., 2017; Duffy, S; 2018). A nivel de elementos virales, se ha observado que las proteínas no estructurales tienen capacidad de inhibir la producción de IFN-1 inducida por el reconocimiento vía RIG-1. Esta inhibición se ha descrito en los serotipos de DENV-1, DENV-2 y DENV-4, ya que sus proteínas NS2A, NS2B y NS4B son capaces de inhibir la fosforilación de TBK1; la inhibición de IRF3 por NS4A se ha observado en infecciones por DENV-1 y se ha descrito el bloqueo de la subsecuente señalización a nivel de IRF3 por la interacción con NS5 de DENV (Miorin, L. et al, 2017). Además de la co-expresión sinérgica de inhibición de NS2A, NS4A y NSAB (Muñoz- Jordán, J.L, 2010), Grant A. y colaboradores (2016), mostraron que NS5 de ZIKV y en estudios anteriores, NS5 de DENV (Muñoz- Jordán, J.L, 2010), son capaces de inhibir la vía de señalización JAK/STAT, por unión competitiva a STAT2, promoviendo su degradación proteasomal, y así provocando el cese de la señalización de IFN-1. (Grant A. et. al, 2016; Miorin, L. et al, 2017).

Varios estudios, han descrito propiedades o mecanismos que han adoptado las proteínas estructurales de los *Flavivirus*, como la actividad enzimática del complejo NS2B/NS3 en DENV, la cual induce la proteólisis de los reguladores de la activación de la transcripción de IFN-1 (Muñoz- Jordán, J.L, 2010). Asimismo, se ha reportado que DENV y WNV han desarrollado mecanismos de fosforilación por sus proteínas NS3, las cuales compiten con la proteína chaperona 14-3-3 ϵ , lo que en consecuencia provoca que RIG-1 no sea trasladada por 14-3-3 ϵ hacia la membrana mitocondrial, impidiendo la señalización subsecuente por MAVS (Chan, Y.K & Gack, M.U, 2016).

No obstante, reportes sobre las mutaciones que sufre la proteína NS1 de ZIKV, han demostrado que promueven su unión a TBK1, resultando en la disminución de la

fosforilación de TBK1 y por lo tanto niveles disminuidos de la expresión de IFN- β (Xia, H. et al., 2018). Además, estudios realizados con WNV han mostrado su capacidad de bloquear la activación de JAK1 y TYK2, donde Laurent-Rolle y colaboradores (2010) denotaron que la NS5 de WNV, es el potente supresor de la señalización de IFN-1 mediante este mecanismo de acción. En adición, algunos reportes muestran que la NS5 de YFV puede asociarse con TRIM23 para formar un complejo dependiente de ubiquitina, el cual es capaz de inhibir a la subunidad STAT2 de ISGF3 y prevenir su unión a los sitios ISRE (Miorin, L. et al, 2017).

Por otro lado, las invaginaciones del ER rugoso que se asocian con las proteínas no estructurales durante la formación de los RC de los *Flavivirus*, permiten la compartimentalización del ssRNA así como de los intermediarios replicativos como el dsRNA, con el fin de no ser detectados por los sensores de la inmunidad innata, mecanismo que ha sido descrito durante las etapas iniciales de infección por DENV y WNV (Muñoz-Jordán, J.L, 2010; Filomatori, C. V. et al., 2017; Neufeldt, C., 2018). También se ha observado, que la síntesis del Cap en las moléculas de ssRNA (+) permite que estas mimeticen al mRNA celular, abatiendo su detección como RNA viral. Sin embargo, uno de los mecanismos de evasión más importantes de los *Flavivirus* depende de la estructura 3' UTR, la fuente del RNA subgenómico no codificante (sfRNA) resultante de la degradación incompleta por la exonucleasa celular (5'-3' XRN1), favoreciendo su acumulación durante la infección (Akiyama, M., et. al, 2016). Se ha descrito en el caso de DENV, que el sfRNA está directamente relacionado con efectos citopáticos y patológicos ya que participa en la inhibición de la fosforilación de IRF3, en la desregulación de la degradación del RNA viral y en la inhibición de las proteínas responsables de la expresión de IFN-1. Este último mecanismo, se ha relacionado ampliamente con la capacidad del sfRNA de DENV de unirse a TRIM25 inhibiendo su desubiquitinación y por ende impidiendo su interacción con RIG-I, evitando así la expresión de los genes para la síntesis de IFN-1 (Manokaran, G. et. al, 2015; Filomatori, C. V. et al., 2017).

3. Antecedentes directos

La evasión de la respuesta inmunológica, es un factor clave que le proporciona a los *Flavivirus* una ventaja evolutiva sobre variantes con menor *fitness*. Durante la selección de variantes de *Flavivirus*, se producen presiones evolutivas debido a la diversidad genética de las poblaciones en regiones endémicas, factor que influencia en el tipo de respuesta inmunológica a la cual los virus se enfrentan (Filomatori, C. et al, 2017).

Dentro de las regiones más importantes donde la distribución de DENV y ZIKV es significativa, México representa un lugar primordial de estudio. Se ha demostrado que la diversidad genética de las poblaciones mexicanas, particularmente de las poblaciones del sur de México, es muy amplia, ya que la arquitectura genética de estos grupos se encuentra influenciada por procesos adaptativos y demográficos, lo que se traduce en diferencias sobre la biología y la salud de las poblaciones. Además de la presencia de grupos étnicos con individuos americano-nativos, México se caracteriza por poseer poblaciones de individuos mestizos, lo que puede influir en la respuesta inmunológica contra *Flavivirus* y la selección de *Flavivirus* con características genéticas y fenotípicas particulares durante los brotes en nuestro país (Romero-Hidalgo, S. et. al, 2017; Sánchez-Leyva, M. et al; 2017).

Se ha reportado que polimorfismos en los genes que codifican para la citocina, TNF- α , se asocian a susceptibilidad a infecciones por DENV, y a la manifestación de presentaciones clínicas severas en diversas regiones del mundo y de México (Filomatori, C. et al, 2017), por lo cual, la susceptibilidad o resistencia a infecciones por *Flavivirus* se ve determinada por los aspectos genéticos de la población. Por otro lado, un estudio demostró que las diferencias entre linajes de ZIKV se basan en las mutaciones que presentan, donde la secuenciación de 20 variantes de ZIKV reveló al menos 15 mutaciones codificantes, mutaciones en la región 3' UTR y dentro de la secuencia de NS5, lo cual determinó el fenotipo de variantes pre-epidémicas y epidémicas (Beaver, J. et al, 2018). Por lo tanto, la relación entre la selección de una nube de mutantes y la variabilidad genética de la población afectada, influye en el *fitness* de las variantes de *Flavivirus* seleccionadas.

En México, la caracterización de este fenómeno no ha sido estudiada y las sugerencias oficiales dentro de protocolos de diagnóstico y epidemiológicos, como la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, no fomentan dichos estudios. Debido a esto, los únicos estudios generados sobre *Flavivirus* en México, se basan en aislados referencia correspondientes a otras zonas geográficas, o en aislados adaptados al laboratorio y no en aislados representativos de la población mexicana. El estudio del fenotipo de evasión de la respuesta inmunológica de IFN-1 de *Flavivirus* mexicanos, podría proporcionar información valiosa de la virulencia, transmisibilidad y *fitness* de los *Flavivirus* circulantes en nuestro país para el apoyo en la toma de decisiones en estrategias de control de vectores o aplicación de candidatos vacunales.

4. Justificación

A pesar de que la NOM-032-SSA2-2014 sugiere el aislamiento de virus del dengue en un 10% de los casos graves, dichos aislados no son caracterizados a nivel de virulencia. De forma similar, no existe regulación para el aislamiento del virus Zika. La evidencia experimental de factores de patogenicidad adquiridos por selección de variantes de *Flavivirus*, ha sido obtenida con virus modelo o con aislados de pacientes o vectores de otras regiones geográficas. Ya que la población mexicana presenta un mosaico de diversidad genética característica, es probable que los factores de patogenicidad adquiridos por los *Flavivirus* circulantes en nuestro país no estén representados en dichos estudios. Por lo cual, la generación de estrategias experimentales que correlacionen con la virulencia, así como la caracterización del fenotipo de evasión de la respuesta de interferones de tipo 1 de *Flavivirus* mexicanos, permitirá expandir el conocimiento acerca de las características de la respuesta inmunológica de la población mexicana y de los factores que influyen la distribución de dichos *Flavivirus* en nuestro país, y a su vez coadyuvar en procedimientos de vigilancia, prevención y control.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Caracterizar los fenotipos de evasión de la respuesta de interferones de tipo 1 de aislados de *Flavivirus* obtenidos a partir de muestras de pacientes en etapa febril de zonas endémicas de infecciones por *Flavivirus* en México.

5.2. Objetivos particulares

- Aislar y amplificar variantes genéticas de *Flavivirus* a partir de sueros de pacientes mexicanos en etapa febril, mediante pases ciegos en cultivo celular hasta obtener títulos utilizables para caracterización experimental fenotípica.
- Determinar la presencia de *Flavivirus* en células Vero inoculadas con diluciones de las muestras amplificadas por inmunofluorescencia indirecta.
- Purificar preparaciones virales a partir de las muestras positivas por inmunodetección y cuantificar el título viral en unidades formadoras de placa mediante inmunocitoquímica.
- Tipificar los aislados obtenidos mediante técnica de RT-PCR para conocer la especie y/o serotipo del *Flavivirus* aislado.
- Evaluar semi-cuantitativamente el fenotipo de evasión de interferones de tipo 1 de los aislados tipificados mediante la comparación del porcentaje de reducción de la infección de células productoras y no productoras de interferones de tipo 1 endógenos.

6. Hipótesis

El fenotipo de evasión de la respuesta de interferones de tipo 1 de aislados de *Flavivirus* mexicanos será diferente al de virus referencia obtenidos de otras regiones geográficas.

7. Materiales y métodos

7.1. Muestras empleadas

En la presente investigación se incluyeron muestras de pacientes de ambos sexos y sin límite de edad, recolectadas al momento en que se presentaron al Hospital General Agustín O'Horán ubicado en Mérida, Yucatán, durante 2016 con sintomatología característica de infección flaviviral según la OMS (2009). Algunos de estos pacientes fueron diagnosticados en el laboratorio del hospital por ELISA para identificar la presencia de anticuerpos contra *Flavivirus*.

Tabla 1. Lista de las características y sintomatología de los donadores con presunta infección por *Flavivirus* utilizados durante la investigación

<i>Muestra</i>	Género del paciente	Edad del paciente	Estado febril (días)	ELISA (DENV)	Observaciones
47	Masculino	8 años	4	IgM (zona gris) IgG (-)	Urgencia pediátrica
96	Femenino	14 años	2	IgM (-) IgG (-)	Ambulatorio
122	Masculino	12 años	2	IgG (+) IgM (-)	Ambulatorio
130	Masculino	22 años	4	IgM (-) IgG (+)	Ambulatorio
142	Masculino	28 años	2	IgM (+) IgG (+)	Ambulatorio
144	Masculino	31 años	3	IgM (-) IgG (+)	Ambulatorio
158	Femenino	22 años	2	IgM (-) IgG (-)	Ambulatorio
159	Masculino	29 años	7	IgM zona gris IgG (+)	Ambulatorio
190	Femenino	20 años	0	---	Ambulatorio

7.2. Cultivo celular

Líneas celulares

Se utilizó la línea celular Vero, células provenientes del epitelio de riñón de mono verde africano, las cuales presentan un defecto genético en el locus de IFN- β , por lo cual son

altamente permisivas a infecciones virales (Chew, T, et. al., 2009). Además, son incapaces de producir ISGs debido a una baja expresión del factor regulador de interferón 3 (IRF-3) ocasionando que no tengan la capacidad de montar un estado antiviral (Chew, T, et. al., 2009). Por otro lado, se utilizó la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos (HFF-1), células productoras de una alta cantidad de IFN- β en respuesta a infecciones virales (Goodbourn S, et. al., 2000; Bustos-Arriaga, J., et. al., 2015)

En botellas para cultivo celular de 25 cm² se sembraron células Vero, para su crecimiento. Fueron mantenidas con 5 mL de medio RPMI (*Biowest*®) suplementado con 1% Antibiótico, 1% L-glutamina y 3% de suero fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Para el uso de las células se esperó alcanzar una confluencia del 100% (Anexo A1) para utilizarlas en la amplificación de los virus, evaluación de la capacidad de evasión y/o titulación de los mismos. Se utilizaron botellas de 75 cm² para obtener una mayor cantidad de células, mantenidas con 10 mL de medio RPMI al 3% SFB, e incubadas a las mismas condiciones.

Para el caso de las células HFF-1, se sembraron de igual forma en botellas para cultivo celular y fueron mantenidas con 5 o 10 mL de medio DMEM (*Biowest*®) (dependiendo del tamaño de la botella de cultivo), suplementado con 1% antibiótico, 1% L-glutamina y 5% de suero fetal bovino e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂.

7.3. Amplificación de muestras de pacientes en etapa febril

7.3.1 Siembra en pozos

Se utilizó una botella con células vero al 100% de confluencia. Las células fueron resuspendidas en medio RPMI 3% SFB y transferidas a un tubo (suspensión A). A partir de la suspensión A, se realizó una dilución 1:10 para que, mediante el uso de la cámara de Neubauer, se contara la cantidad de células y así se obtuviera el volumen total de suspensión A para contener 200,000 células por cada 2 mL (volumen por cada pozo) en 12 mL totales para la placa (suspensión B). Finalmente, a partir de la suspensión B se sembraron 2 mL por pozo, incubando la placa a 37°C/ 5% CO₂. La cantidad de botellas utilizadas dependía del número de muestras a amplificar, aproximadamente, 2 botellas de 25 cm² proporcionaban suficientes células para el plaqueo de 2 placas de 6 pozos para 12 muestras.

El proceso de siembra en pozos se realizó de la misma forma para placas de 12 y 24 pozos utilizadas durante el estudio, sin embargo el número de botellas utilizadas variaba de acuerdo al número de células a utilizar por pozo y la cantidad de placas, por ejemplo, una botella de 75 cm² 100% confluyente fue utilizada para la siembra de 3 placas de 24 pozos con 100,000 células Vero/pozo o 80,000 células HFF-1/pozo.

7.3.2 Infección de placas

A partir de una placa de 6 pozos previamente sembrada y con una confluencia mínima de 80% (**Anexo A1.2**), se inocularon las monocapas con 50 µL de diluciones 1:40 de los sueros presuntamente positivos a infección por *Flavivirus*, adicionando medio RPMI suficiente para únicamente cubrir la monocapa (íntimo contacto partícula viral-células). Se mantuvo la infección por 1 h a 37°C/5% CO₂ y al finalizar se colocó medio RPMI al 3% SFB hasta completar el volumen total por pozo, movilizándolo el sobrenadante y monitoreando la infección los días posteriores.

7.3.3 Cosecha de aislados

Una vez observando efecto citopático y/o muerte celular (**Anexo A2**), en un tiempo máximo de 7 días post-infección, se recuperó el sobrenadante, se fraccionó en volúmenes de 100 µL y 500 µL los cuales se almacenaron a -70°C para uso posterior.

7.3.4 Pases ciegos

Los sobrenadantes fraccionados fueron utilizados para continuar la amplificación hasta llegar a los 5 pases ciegos, infectando de la misma forma como se describe en el apartado 7.3.2. Se determinó el título viral de los aislados, mediante la titulación de las unidades formadoras de placa por inmunocitoquímica y únicamente se seleccionaron las muestras 47 y 96 que presentaron títulos utilizables ($\geq 10^7$ PFU/mL). Se continuaron los pases de las muestras seleccionadas para elevar el título viral.

7.4 Titulación de aislados positivos mediante inmunocitoquímica

En placas de 24 pozos se titularon los aislados virales, mediante la técnica de inmunocitoquímica con diluciones decimales seriadas del aislado, comenzando por el concentrado o 10^0 hasta la dilución de 10^{-5} . Se inocularon en monocapas de células Vero 80-100% confluentes, realizándolo por duplicado. La infección se realizó de acuerdo al apartado 7.3.2 y se mantuvo en medio semisólido Overlay (*Sigma*®), preparado con metilcelulosa al 1.5%, medio RPMI base, 1% antibiótico, 2% SFB por 4 días para favorecer la formación de placas.

7.4.1 Inmunocitoquímica de unidades formadoras de placa (PFU)

Para evidenciar las placas, se realizaron lavados de las monocapas y las células se fijaron con metanol al 85%. Se realizó un bloqueo con buffer de bloqueo (leche descremada al 0.8%) para posteriormente adicionar un anticuerpo monoclonal dirigido contra el péptido fusogénico presente en el dominio II de la proteína E (mAb 4G2 pan-flavivirus). Posteriormente se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (*Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-mouse IgG KPL*®) y las placas se revelaron con el sustrato de peroxidasa precipitable 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno (*KLP TrueBlue*® *Sera Care*). Las placas color azul se contaron manualmente y el título se expresó en escala logarítmica utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Log } (x \text{ placas} \times 10^{\text{dilución revelada positiva} + 1})$$

Donde x es el promedio de placas contadas. El número de PFU se obtiene elevando 10 al logaritmo obtenido.

Los sobrenadantes obtenidos a partir de los pases ciegos ya titulados, fueron clarificados mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se crioprotegió con SPG (sacarosa-fosfato-glutamato) y se fraccionó en volúmenes de 100 μ L para ser almacenados a -70°C para su uso posterior.

7.5 Determinación de la presencia de la proteína de envoltura flaviviral en las muestras amplificadas por inmunofluorescencia indirecta.

Se sembraron aproximadamente 80, 000 células Vero y HFF-1 en cubreobjetos de vidrio y se infectaron a 3 MOI con el virus referencia DENV-1 WP (clave de acceso a GenBank AY145121.1) y con el aislado mexicano, ZIKV Oaxaca, caracterizado previamente por nuestro grupo (Gómez Legorreta, C.; 2019) así como con los aislados obtenidos. Se mantuvo la infección por 48 horas y posteriormente las células se fijaron con *p*-formaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron con una solución de 30% dietilen glicol, 9.99% formaldehído y 3.51% metanol (*FACSTM Permeabilizing Solution 2 (IX) Perm2 BD Biosciences*) durante 1 hora a 4°C y se incubaron 1 hora con una dilución 1:800 del anticuerpo mAb 4G2 en una cámara húmeda a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario FITC 546 contra IgG de rata Rat anti-mouse IgG (*BioLegend®*) en una dilución 1:200 durante 1 hora en cámara húmeda y aislamiento de luz. Finalmente, las células se lavaron y se colocaron en medio de montaje con DAPI (1 mg/mL) para contrastar el núcleo, sobre portaobjetos. Las muestras fueron analizadas y fotografiadas por microscopía confocal en un microscopio SP-6 (Leica).

7.6 Tipificación de aislados positivos mediante RT-PCR

7.6.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante la técnica de fenol-cloroformo, a partir de 500 µL de las muestras positivas amplificadas (stock). En un microtubo se adicionaron 500 µL del aislado viral obtenido y 500 µL de solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (*RiboZol®*), se agitó y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. A la mezcla, se le adicionó 1:5 partes cloroformo 99.8% (*Meyer®*) (150 µL) y se agitó hasta obtener una apariencia rosada, turbia y homogénea. Se incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm, 15 minutos a 4°C.

La mezcla se separó en una fase orgánica inferior y una fase acuosa incolora superior, que contenía el RNA. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un nuevo microtubo y

se le adicionó 1:2 partes de isopropanol 99.5% (*Meyer*®) (250 µL) para precipitar el RNA. Se incubó de 3 a 5 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm, 10 minutos a 4°C. El primer lavado se realizó, considerando la ubicación de la pastilla, mediante la remoción del sobrenadante, y agregando 200 µL de etanol 70% para lavar la pastilla, sin agitación para mantener la integridad del RNA. Se llevó a centrifugación a 13,000 rpm, 10 minutos a 4°C. El mismo procedimiento se repitió para el segundo lavado pero con centrifugación de 5 minutos a las mismas condiciones.

Finalmente se retiró el sobrenadante y se permitió la evaporación del etanol restante de 20 a 30 minutos. El RNA se solubilizó en 10 µL de agua 3D, tratando de que esta tocara toda la pared del tubo. Utilizando 2 µL de cada muestra, se cuantificó la cantidad de ng/mL de RNA por espectrofotometría en el equipo IMPLN Nano Photometer NP80, utilizando como blanco 2 µL de agua 3D.

7.6.2 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR

En microtubos, por cada muestra, se adicionó: 1 µL dNTP 10mM (*Thermo*®), 0.6 µL de oligonucleótidos degenerados o hexámeros 3 µg/µL (Random primers) (*Thermo*®), 6.1 µL de agua 3D y 8 µL de RNA. Se colocaron los microtubos en el termociclador y se incubaron a 65°C durante 5 minutos. Finalizado el tiempo, se adicionaron 4 µL de Buffer RT 5x (*Thermo*®) y 0.3 µL de retrotranscriptasa recombinante de la leucemia murina de Maloney 200U/ µL (*Thermo*®) Para la síntesis, las muestras se corrieron a las condiciones de RT-PCR mostradas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de RT-PCR para la síntesis de cDNA a partir de RNA

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>
25	10
42	60
70	10
4	∞

7.6.3 Tipificación

Para identificar la especie de *Flavivirus* en los aislados obtenidos, se utilizaron los oligonucleótidos para dengue (D1-forward y D2-reverse) de acuerdo con Lanciotti (Lanciotti, R.S., et. al., 1992) y los oligonucleótidos ZIKV-ENV diseñados por la Dra. Leticia Cedillo Barrón (Biomedicina molecular, CINVESTAV) mostrados en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de los aislados

Oligonucleótido	Flavivirus	Secuencia	Posición en el genoma	Tamaño del amplicón (pb)
D1	DENV	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134-161	511
D2	DENV	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGG TTC-3'	616-644	511
ZIKV-ENV (forward)	ZIKV	5'-GCTGGDGCRGACACHGGRAC T-3'	1538-1558	364
ZIKV-ENV (reverse)	ZIKV	5'-RTCYACYGCCATYTGG RCTG -3'	1883-1902	364

Antes de comenzar la preparación de las reacciones, se cuantificó la cantidad de cDNA de cada muestra en el equipo IMPLN Nano Photometer NP80.

7.6.3.1 PCR

En un microtubo, para cada reacción, se adicionó 1 µL de buffer Taq polimerasa 10X (*Thermo*®), 0.2 µL de dNTPSs (*Thermo*®), 0.3 µL de los oligonucleótidos específicos a 10mM cada uno, 0.5 µL MgCl₂ 25 Mm (*Thermo*®), el volumen necesario de la muestra correspondiente a 1 µg de cDNA y agua 3D para completar el volumen a 9.8 µL. Se completó a 10 µL finales de la reacción, adicionando al final 0.2 µL de enzima Taq polimerasa 5U/ µL (*Thermo*®), se agitó y la reacción se llevó al termociclador a diferentes condiciones de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados (**Tabla 4**).

Tabla 4. Condiciones para las reacciones de PCR de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados

Zika			Dengue SCX*		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Precalentar	105	2 min	Precalentar	105	2 min
1	95	2 min	1	94	2 min
35	95	20 seg	35	94	30 seg
35	58	20 seg	35	52.5	30 seg
35	68	30 seg	35	68	1:30 min
1	68	7 min	1	68	7 min
---	4	∞	---	4	∞

*SCX: Dengue SeroComplex

Además de las muestras, se realizaron las reacciones de los controles positivos para Zika y para dengue, ZIKV Puerto Rico y DENV-1 Western Pacific respectivamente.

La temperatura de 95°C o 94°C permitió la desnaturalización del cDNA para la separación de las dos cadenas, después la temperatura disminuyó a 58°C o 52.5°C para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos y finalmente el aumento de temperatura a 68°C permitió la elongación de la cadena.

7.6.3.2 Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa 1.5% preparado con TAE 1X (Tris (hidroximetil) aminometano, ácido acético y ácido etilendiamino tetra-acético), se cargaron los pozos con 8 µL de la mezcla de reacción y 1 µL buffer de carga 6X. Se aplicó una corriente de 85 volts durante 43 minutos y se reveló el gel con 1 µL de bromuro de etidio. La fotodocumentación se realizó por transiluminación UV en el equipo GelDoc™ EZ Documentation System de Bio-Rad.

7.7 Comparación del porcentaje de infección de células no productoras y productoras de IFN tipo 1

Se utilizaron células Vero, incapaces de producir IFN de tipo 1 debido a su falta del factor regulador de interferón 3 (IRF3) que promueve la transcripción de genes de IFNs de tipo 1; y células HFF-1 con la capacidad de producir IFN de tipo 1.

7.7.1 Infección de células Vero y HFF-1 y cosecha de sobrenadante

Se sembraron placas de 12 pozos con 100,000 células Vero/ pozo y otra placa con 80,000 HFF-1/ pozo. Se llevó a cabo la infección de las monocapas, como se describe en el apartado 7.3.2 pero a 0.1 MOI, utilizando los aislados positivos con el título viral establecido, y realizándolo por duplicado (**Tabla 5**).

Tabla 5. Lista de los virus utilizados, su título viral y el volumen de suspensión viral utilizados para la infección a 0.1 MOI

<i>Muestra</i>	Título viral (Log)	Volumen a 0.1 MOI en línea Vero (µL)	Volumen a 0.1 MOI en línea HFF-1(µL)
47	7.14	1.93	1.55
96	7.44	0.97	0.77
ZIKV PR	7.02	2.54	2.03
DENV WP	5.97	28.57	22.85

La infección se mantuvo por seis días y se cosecharon 100 µL cada día, fraccionando el sobrenadante en alícuotas de 50 µL y reponiendo el volumen obtenido para mantener constante el volumen de medio.

7.7.2 Titulación de los sobrenadantes

Se llevaron a cabo las titulaciones de todos los sobrenadantes cosechados en cada uno de los seis días post infección, tanto las obtenidas a partir de células Vero como de células HFF-1, realizado de acuerdo con el apartado 7.4, utilizando monocapas de células Vero en placas de 24 pozos. El título viral se expresó en escala logarítmica.

8. Resultados

Evidencia de la presencia de Flavivirus en los aislados estudiados mediante titulación de PFUs/mL por inmunocitoquímica.

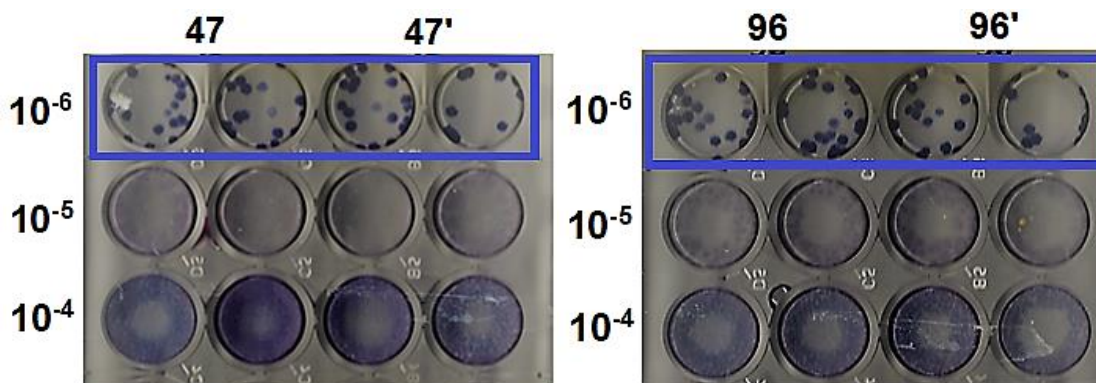


Figura 15. Unidades formadoras de placas representativas de las muestras YUC 47, YUC 96 y sus duplicados en células Vero. Titulaciones representativas de las muestras estudiadas, donde las PFUs fueron contadas manualmente y el título viral fue expresado en escala logarítmica. La morfología de las placas se distingue por ser circular, con contornos bien definidos, de tamaño mediano y color azul intenso. La morfología de PFUs fue altamente similar a las generadas por DENV-1 WP, se mantuvo dicho patrón durante todas las titulaciones (ver **Anexo A5**). El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFUs. La selección de la dilución adecuada era determinada por el número de PFUs presentes, considerando como límite inferior 3 PFU y 30 PFUs como límite máximo. Los títulos utilizables se obtuvieron a partir del pase 10 para YUC-47 y pase 9 para YUC-96. Todas las titulaciones se realizaron por duplicado.

La presencia de PFUs durante las titulaciones demostró que los aislados estudiados pertenecen al género *Flavivirus*, debido a que fueron reconocidos por el anticuerpo *pan-Flavivirus* 4G2 específico para el péptido fusogénico de la proteína de envoltura flaviviral.

Tipificación de aislados para identificar la especie de Flavivirus

Con la intención de identificar la especie de *Flavivirus* de las muestras aisladas, se realizó la extracción de RNA viral a partir de abastos de los aislados (crioprotegidos con SPG). El cDNA generado, se utilizó en reacciones de PCR (**Figura 16**) con los oligonucleótidos que identifican a DENV y ZIKV.

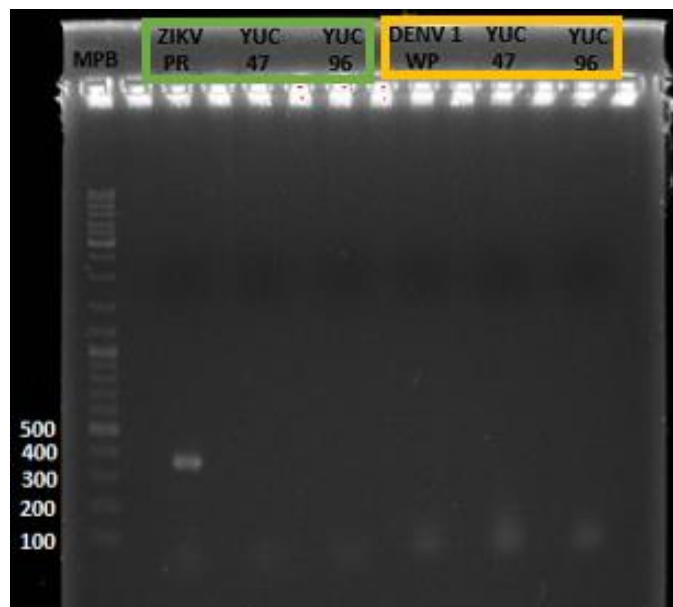


Figura 16. Electroforesis de las reacciones de PCR obtenidas de los aislados, ZIKV PR y DENV-1 WP. Las muestras marcadas con el recuadro verde indican las muestras de PCR con oligonucleótidos para determinar ZIKV. Las muestras marcadas con el recuadro amarillo indican las muestras de PCR con oligonucleótidos para determinar DENV. Se utilizó Zika Puerto Rico (ZIKV PR) y DENV 1 Western Pacific (DENV-1 WP) como controles para ZIKV y DENV, respectivamente. MPB indica el marcador de pares de bases o marcador de peso molecular. Se observa una única banda, correspondiente a ZIKV PR, sin embargo, las muestras YUC-47 y YUC-96, no muestran amplificación con ninguno de los oligonucleótidos utilizados. De igual forma no se observa amplificación para el control positivo DENV 1 WP.

Se observa en la **Figura 16**, que las muestras no fueron identificadas como ZIKV debido a que no se observan bandas de amplificación en los carriles correspondientes a YUC-47 ni YUC-96 con los oligonucleótidos para ZIKV, a diferencia del control ZIKV PR que muestra el amplicón con el tamaño molecular esperado (364 pb). Sin embargo, tampoco se observan bandas de amplificación con los oligonucleótidos para DENV, incluyendo el control positivo DENV-1 WP. Los datos observados sugieren que las muestras no son ZIKV pero debido a la ausencia de amplicones para DENV, la identificación es inconclusa.

Evaluación cualitativa de la capacidad de evasión la respuesta de IFN-1 de los aislados de Flavivirus mexicanos por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para incluir una representación cualitativa que demostrara la presencia de *Flavivirus* en las muestras analizadas y a la vez evaluar cualitativamente la capacidad de evasión de IFN-

1 de las mismas, se realizó un análisis por microscopía confocal para identificar la presencia de proteínas flavivirales en células Vero y células HFF-1.

La **Figura 17** muestra imágenes representativas de células Vero infectadas con las muestras estudiadas, YUC-47 y YUC-96 así como del control positivo DENV-1 WP. Esta línea celular se utilizó para permitir la amplificación de los aislados debido a su alta permisividad a infecciones virales derivada de un defecto genético en el locus de IFN- β y baja expresión de IRF-3 (Chew, T, et. al., 2009). Además, se utilizaron para establecer el punto de referencia de máxima infectividad que fue utilizado posteriormente para calcular el porcentaje de reducción de la infección. Las células fueron fijadas y permeabilizadas para ser teñidas mediante IFI a los 2 días post infección.

Se observa que la mayoría de las células en el campo fotografiado, tienen presencia de proteína E, lo que demuestra la susceptibilidad de las células Vero y además se muestra cualitativamente que ambos aislados son virus del género *Flavivirus* ya que el anticuerpo monoclonal reconoce específicamente el péptido fusogénico flaviviral. Podemos observar un mayor número de células infectadas con YUC-96 en comparación con YUC-47 e incluso más que DENV-1, lo que sugiere que probablemente es capaz de ingresar a las células y/o replicar más rápidamente que YUC-47 y DENV- 1 WP durante el tiempo dado de infección. Cabe destacar que, YUC-47 y YUC-96 muestran mejor capacidad de infectar a las células que la observada por DEN-1 WP referencia

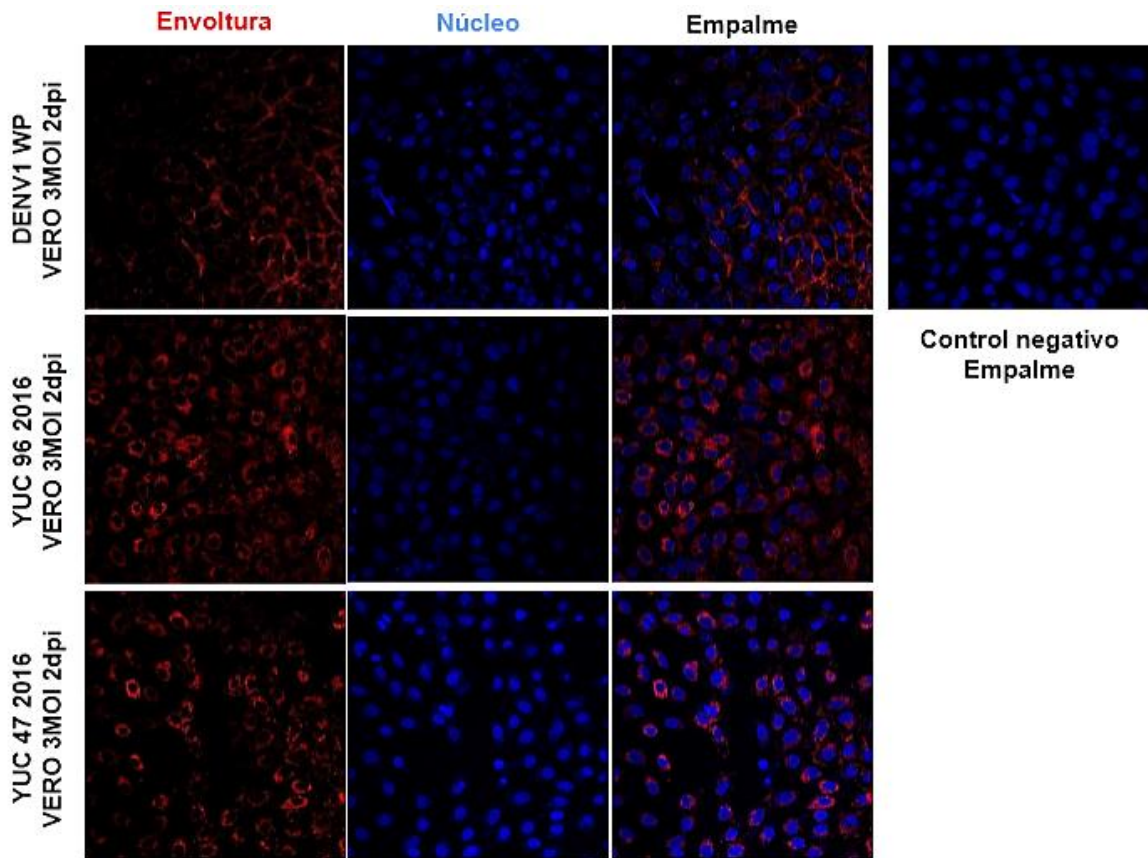


Figura 17. Microscopía confocal de células Vero infectadas con las muestras YUC 47, YUC 96 y DENV-1 WP. La infección se realizó a 3 MOI y se mantuvo por 2 días. Para detectar a la proteína de envoltura se realizó IFI, comprobando que los aislados son *Flavivirus*. La proteína de envoltura se observa en color rojo y el contraste del núcleo celular con DAPI se observa en color azul.

Para evaluar cualitativamente la capacidad de evasión de la respuesta de IFN-1 de los aislados obtenidos, se infectaron células HFF-1, debido a la alta cantidad de IFN- β que producen, para así generar un estado antiviral en respuesta a la presencia de los *Flavivirus* (Goodbourn S, et. al., 2000; Bustos-Arriaga, J., et. al., 2015). La **Figura 18** muestra imágenes representativas de células HFF-1 infectadas con las muestras estudiadas, YUC-47 y YUC-96, y con el control positivo DENV-1 WP, las cuales fueron fijadas y permeabilizadas para después teñirlas mediante IFI y determinar la presencia de proteína de envoltura.

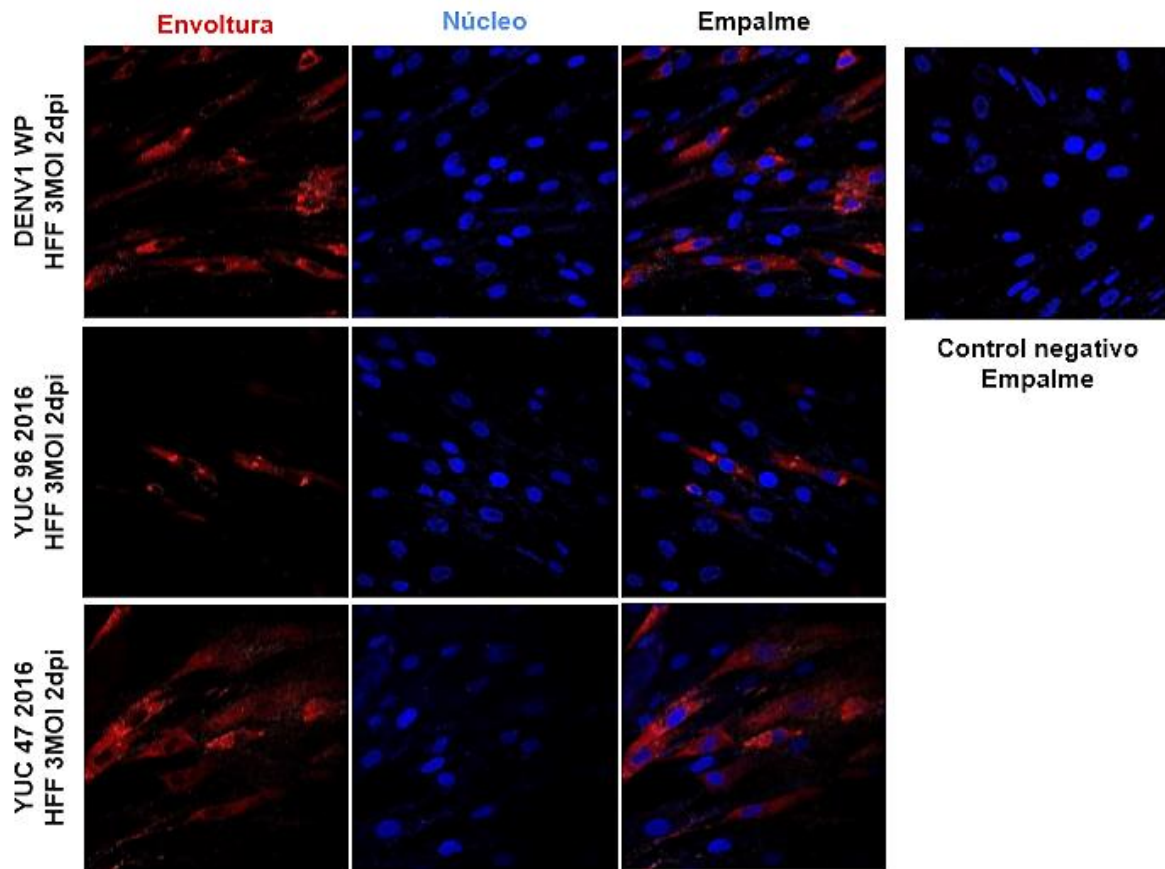


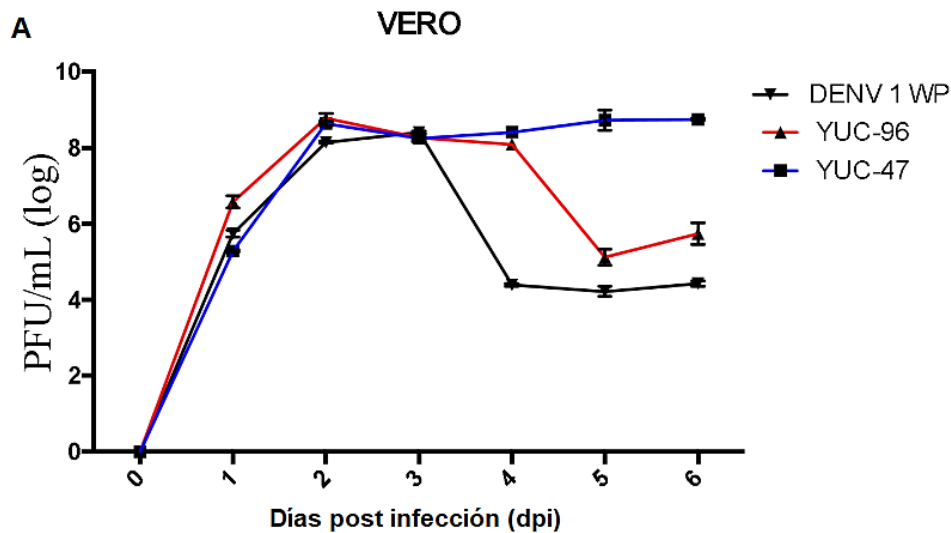
Figura 18. Representación cualitativa de la capacidad de evasión de IFN-1 endógenos de YUC 47, YUC 96 y DENV-1 WP. La infección de las células HFF-1 se realizó a 3 MOI y se mantuvo por 2 días. Para detectar a la proteína de envoltura se realizó IFI. La proteína de envoltura se observa en color rojo y el contraste del núcleo celular con DAPI se observa en color azul. Se observa que en el campo fotografiado, YUC-47 infecta a una mayor cantidad de células en comparación con YUC-96 y DENV-1 WP. Sin embargo, YUC-96 y DENV-1 WP muestran evidencia de mantener infección en estas células.

La presencia de fluorescencia emitida por el anticuerpo marcado que reconoce 4G2 debido a que este se encuentra reconociendo al péptido fusogénico de la proteína E flaviviral, indica que YUC-47 y YUC-96 son capaces de infectar células productoras de IFN-1. Sin embargo, a diferencia de las células Vero, la emisión de fluorescencia no está presente en la mayoría de las células del campo fotografiado. Con las fotografías obtenidas a partir de IFI, se corrobora cualitativamente que los aislados pertenecen a virus del género *Flavivirus* y no a algún otro género de virus que pueda presentar sintomatología similar como CHIKV (CDC, 2018). Cabe resaltar que aunque se comprueba que los aislados son capaces de mantener infecciones en células productoras de IFN-1, YUC-47 infecta una mayor cantidad de células

al igual como lo hace DENV-1 WP, pero mostrando una mayor cobertura de infección en el campo fotografiado. Sin embargo, YUC-96, a pesar de ser capaz de infectar a dichas células, no emite una señal tan clara y prominente que alcance los niveles de DENV-1WP o de YUC-47.

Cinética de infección de los aislados estudiados en células no productoras y productoras de IFN-1 endógenos.

Una vez comprobada la presencia de *Flavivirus* (Figura 18), se llevó a cabo la evaluación semi-cuantitativa de la capacidad de evasión de los aislados estudiados, iniciando por una cinética de infección de células no productoras de IFN-1, Vero y de células productoras de una gran cantidad de IFN-1, HFF-1. Ambos linajes, se infectaron a 0.1 MOI, manteniendo la infección durante 6 días y recolectando el sobrenadante cada 24 horas. Los sobrenadantes de ambas cinéticas fueron titulados por inmunocitoquímica (Figura 19)



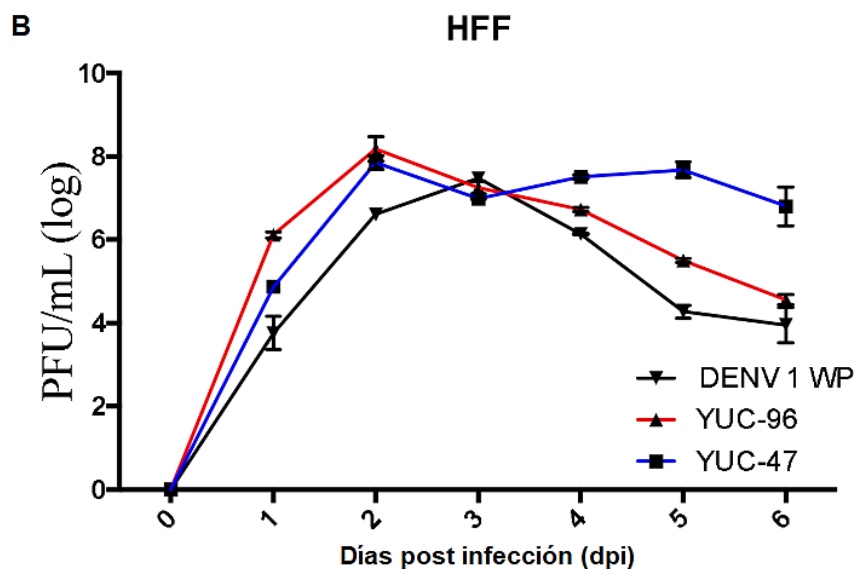


Figura 19. Cinética de infección de los aislados YUC-47, YUC-96 y DENV-1 WP en células productoras y no productoras de IFN-1. **A)** Fluctuación del título viral (PFU/mL en escala Log) durante la cinética de infección de 6 días en células Vero (no productoras de IFN-1). **B)** Fluctuación del título viral (PFU/mL en escala Log) durante la cinética de infección de 6 días en células HFF-1 (altas productoras de IFN-1).

En la **Figura 19A**, se observa que los aislados mantuvieron una infección creciente que comenzó a fluctuar a partir de los 3 días post infección en células Vero, sin embargo, la muestra YUC-47 se mantuvo en títulos constantes hasta el último día en comparación con DENV-1 WP y YUC-96, cuyo título disminuyó. De igual forma, los títulos observados en HFF-1 (**Figura 19B**) presentaron el mismo patrón, aunque con una disminución en el título viral, demostrando la capacidad de las muestras de infectar células productoras de IFN-1.

Cabe destacar que, durante el monitoreo de la monocapa de células Vero y HFF-1, durante la cinética, se observó un mayor efecto citopático y muerte celular (**Figura 20**) en las infecciones con los virus DENV-1 WP y YUC-96 que por YUC-47, (**Figura 20**). Este aspecto pudo influenciar la disminución del título viral de YUC-96 y DENV-1 WP a partir del día 3 post infección.

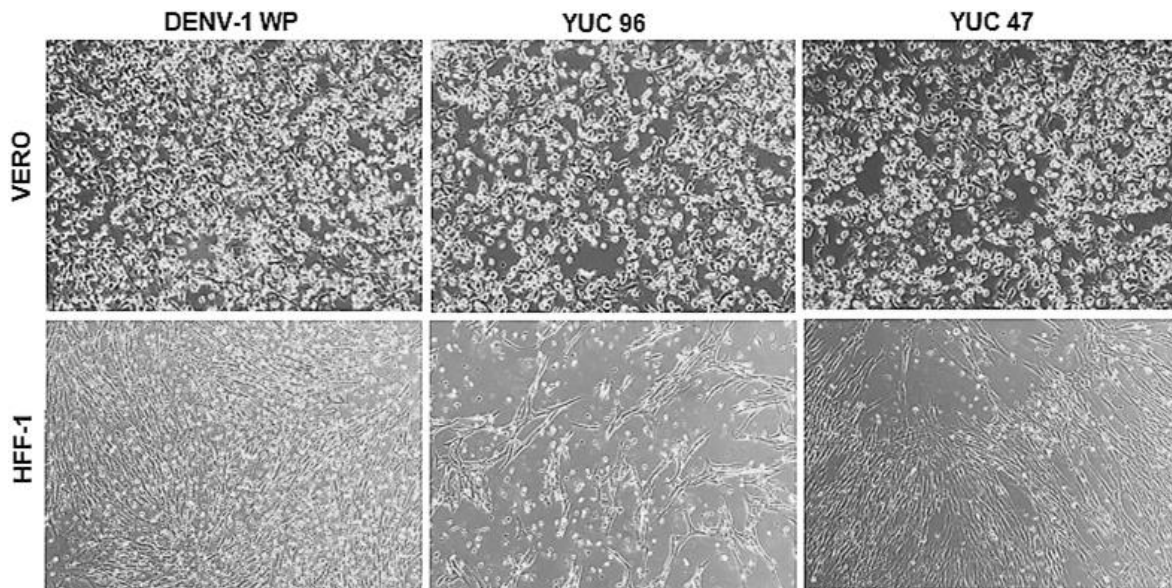
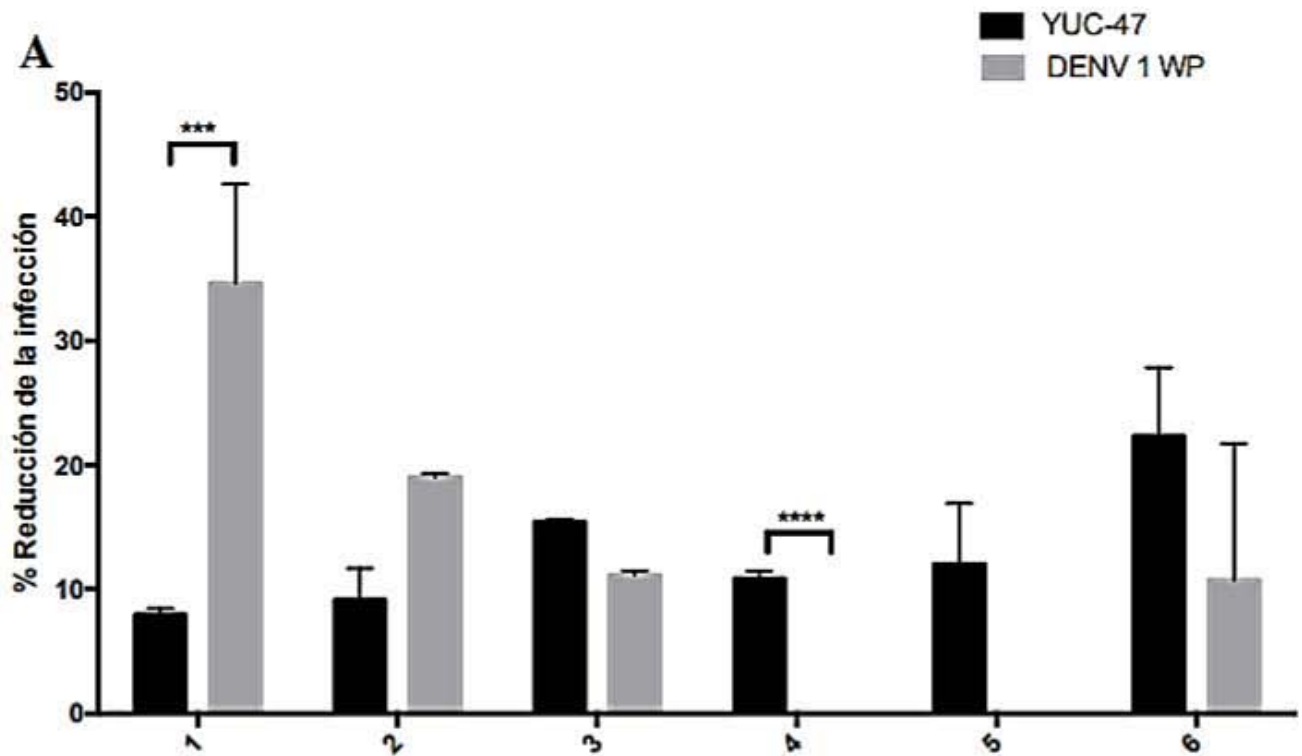


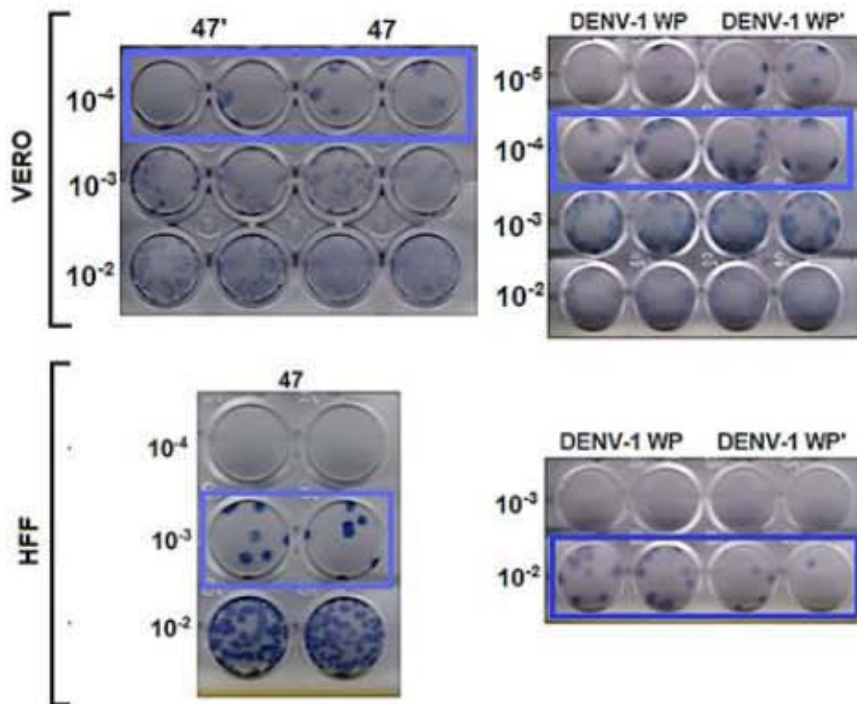
Figura 20. Efecto citopático producido en células Vero y HFF-1 por las muestras YUC-47, YUC-96 y DENV-1 WP a 5 días post-infección. Se observa una amplia cantidad de muerte celular a consecuencia de la infección por DENV-1 WP en ambos linajes celulares. Las células infectadas con YUC-96 presentan efecto citopático sin abundante muerte celular a comparación de DENV-1 WP. La morfología celular de células Vero infectadas por YUC-47 se ve afectada pero la monocapa, se mantiene aunque en baja proporción, sin embargo la mayoría de las HFF-1 infectadas por YUC-47 se observan en buen estado, con una morfología normal (ver **Anexo A1-A4**). La monocapa de HFF-1 infectada con YUC-96 tiene una confluencia del 20-30% con destacada muerte celular; la morfología celular es irregular. DENV-1 WP produce efecto citopático destacado, la muerte celular predomina (ver **Anexo A3 y A4**).

Comparación de la capacidad de evasión de IFN-1 en células HFF-1 de los aislados, ante DENV-1 WP

Para determinar la capacidad de evasión de los aislados, los títulos virales obtenidos a partir de las cinéticas de infección fueron utilizados para obtener el porcentaje de reducción de la infección. Se consideró como 100% de infección a los títulos obtenidos a partir de la cinética de infección en células Vero. El porcentaje de reducción de la infección, se obtuvo mediante la diferencia entre los títulos en células Vero y los títulos obtenidos en la cinética de infección en células HFF-1. La **Figura 21** muestra los porcentajes de reducción de la infección de YUC-47 y DENV-1, y la **Figura 22** de YUC-96 y DENV-1, al ser retados ante una respuesta antiviral producida por las células HFF-1.



B 1 día post infección



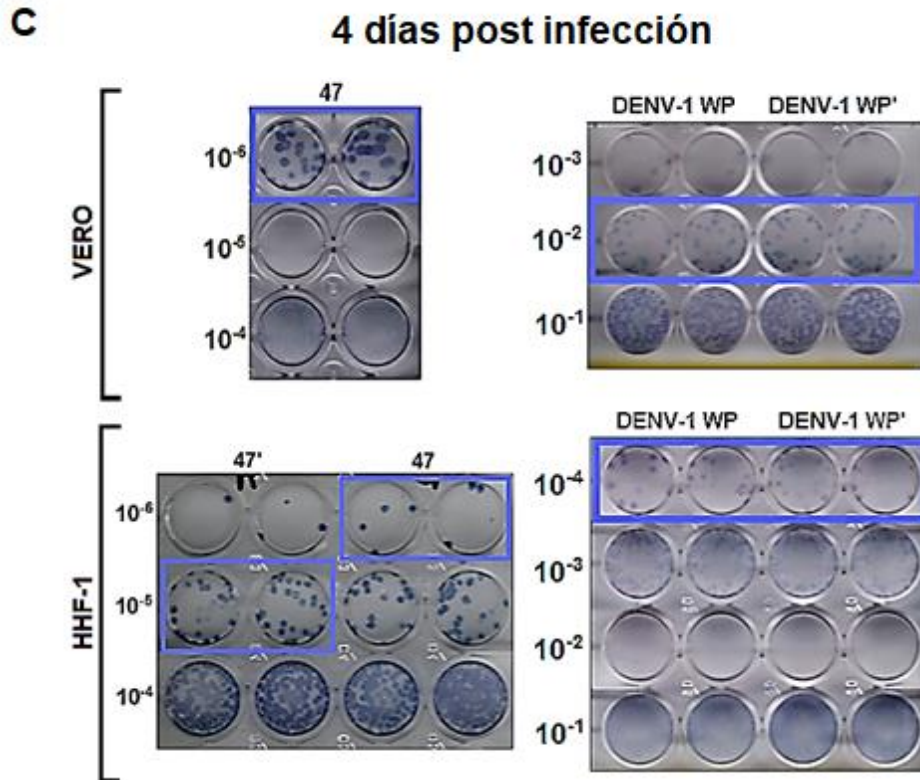
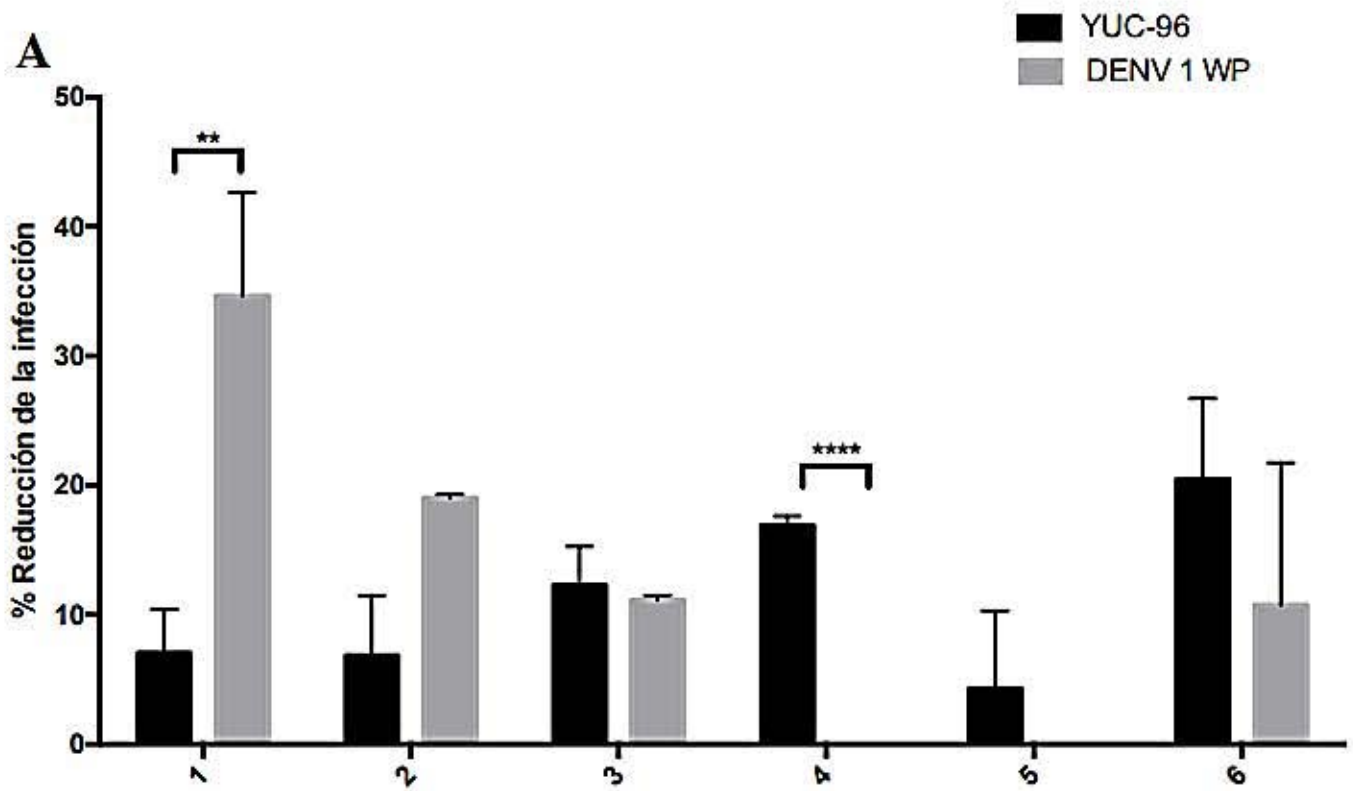
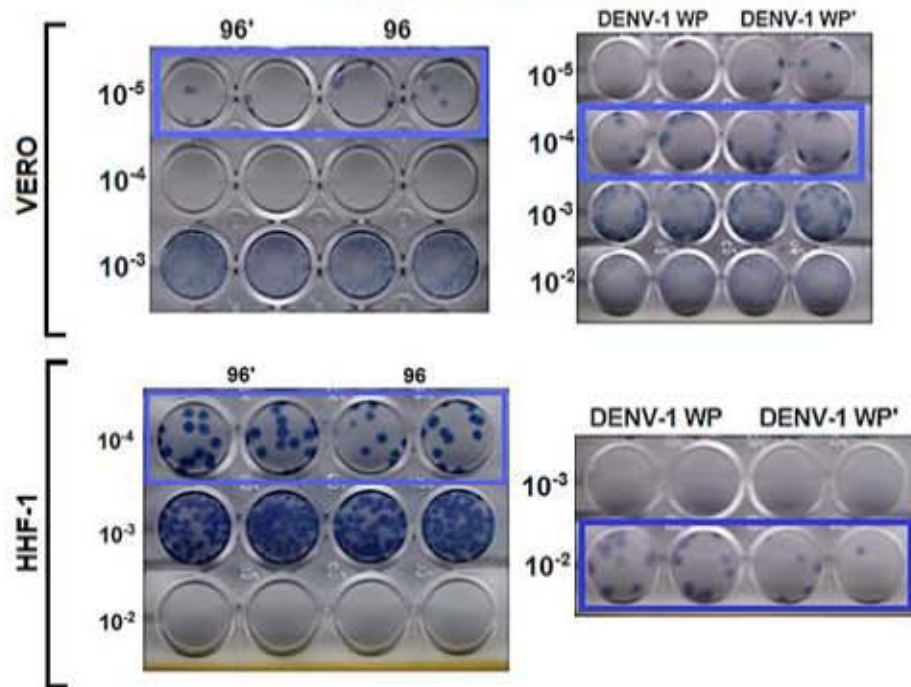


Figura 21. Porcentaje de reducción de la infección de YUC-47 en comparación con DENV-1 WP, inducida por IFN-1 endógenos. A) Se observa que existe un menor porcentaje de reducción de la infección significativa en el primer día post infección ($P < 0.001$), a diferencia de DENV-1 WP cuya infección se redujo por arriba del 30%. Sin embargo, el día 4 post infección de YUC-47 muestra una gran significancia ($P < 0.0001$) debido a que la infección se mantuvo y no disminuyó. **B y C)** PFUs obtenidas durante la titulación de los aislados en el día 1 y 4 post infección, respectivamente. Se observa la variación de los títulos virales en células Vero y HFF-1 representando cuantitativamente la capacidad de infección de los aislados en células productoras de IFN-1. Se observa que las diluciones a las que se consideraron las PFUs difieren en una unidad decimal en HFF-1, denotando que la disminución del título viral no es drástico. Los datos se analizaron por ANOVA multifactorial con repeticiones múltiples y corrección de Bonferroni.



B

1 día post infección



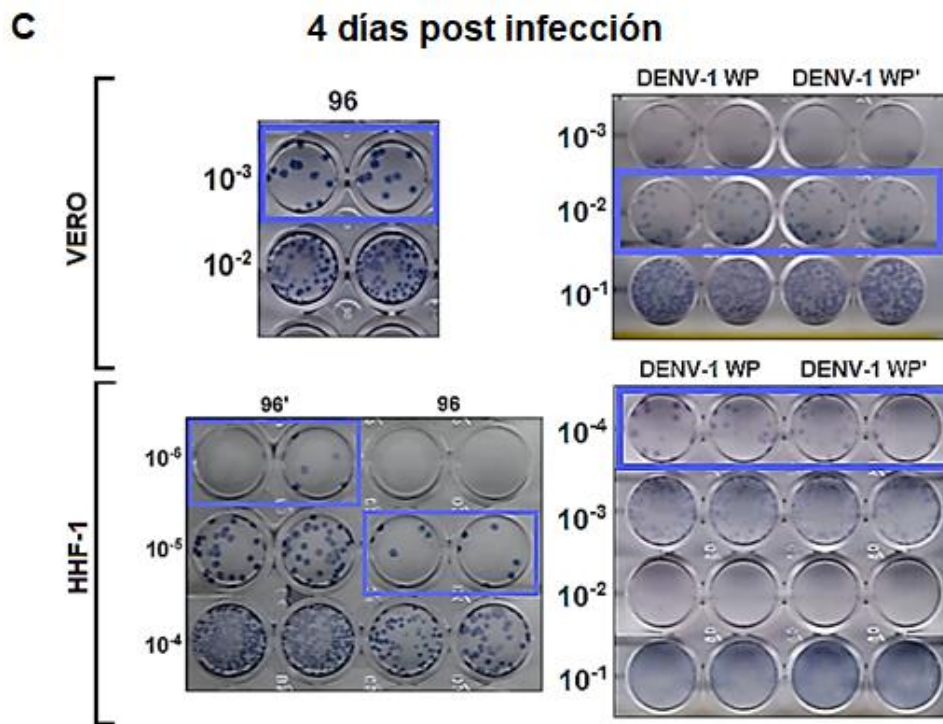


Figura 22. Porcentaje de reducción de la infección de YUC 96 en comparación con DENV-1 WP, inducida por IFN-1 endógenos. A) El porcentaje de reducción de la infección en el primer día post infección ($p < 0.01$) muestra significancia con respecto a la capacidad de infección del virus siendo este mayor que DENV-1 WP. La infección observada en el día 4 post infección muestra una mayor significancia ($p < 0.0001$) debido a la prevalencia de títulos virales altos con respecto al 100% de infección. Sin embargo, a pesar de no mostrar significancia, el día 5 post infección muestra un aumento de la infección evidente. **B y C)** PFUs obtenidas durante la titulación de los aislados en el día 1 y 4 post infección, respectivamente. Se observa la variación de los títulos virales en células Vero y HFF-1 representando cuantitativamente la capacidad de infección de los aislados en células productoras de IFN-1, donde los títulos únicamente se posicionaron una dilución debajo de la dilución de 100% de infección en el día correspondiente. Los datos se analizaron por ANOVA multifactorial con repeticiones múltiples y corrección de Bonferroni.

Se observó que durante los primeros dos días post infección, ambas muestras mostraron capacidad para infectar las células HFF-1, más eficientemente que la infección producida por DENV-1 WP (menor porcentaje de reducción en la infección). Sin embargo, esta capacidad no fue mantenida durante el resto de la cinética de infección por YUC-96, ya que el porcentaje de reducción de la infección aumentó, fenómeno similar al que se generó con DENV-1 WP, siendo YUC-47 la única que presenta títulos estables durante la cinética. Estos datos muestran que los aislados obtenidos fueron capaces de evadir los mecanismos de

evasión inicialmente, pero únicamente YUC-96, al igual que DENV-1 WP, no mantuvieron la infección durante los días restantes, aspecto atribuido a la falta de sustrato celular debido al efecto citopático que produjeron. También podemos observar que YUC-96 muestra una capacidad de evasión mayor a la de DENV-1 WP, ya que hay un aumento mayor en la reducción de la infección por parte de DENV-1 WP durante los primeros 3 días post infección, sin embargo, YUC-96 muestra un fenotipo evasor similar al de DENV-1 WP con respecto al daño celular que provocan. Por el contrario, YUC-47 es capaz de mantener la infección durante toda la cinética con dos días que muestran datos significativos para el estudio, que puede atribuirse a un fenotipo de menor efecto citopático que el observado con YUC-96 y DENV-1 WP (**Figura 19**). Por lo cual, es importante resaltar que de acuerdo a lo observado en la **Figura 20**, YUC-47 no produce un elevado efecto citopático como lo produjo la muestra YUC-96 y DENV-1 WP, factor que pudo influir favorablemente la replicación de YUC-47.

9. Discusión

La respuesta inmunológica innata, representa la primera línea de defensa contra las infecciones producidas por *Flavivirus* y muchos otros virus patógenos. Se sabe que la acción de los IFN-1 representa el mecanismo primordial de la respuesta antiviral innata, ya que son citocinas que favorecen la contención y eliminación de las infecciones virales por el establecimiento de microambientes antivirales en el sitio de inoculación (Owen, J., 2014). Sin embargo, los *Flavivirus* han adquirido la capacidad de evadir dicha respuesta debido al grado de mutaciones puntuales en su genoma, producto de la baja fidelidad de la RdRp. La formación de una nube de mutantes, implica la selección de aquellas variantes capaces de adaptarse y sobrepasar presiones evolutivas, siendo la diversidad de la respuesta inmunológica innata en los hospederos, una de las presiones más relevantes. De esta forma, la selección determina a la población de *Flavivirus* capaz de producir infecciones productivas en una región geográfica específica, lo que les confiere un mayor *fitness* (Guzman, M. et. al., 2016; Filomatori, C. et al, 2017).

Debido a que la población mexicana se caracteriza por mantener una amplia diversidad genética, las diferencias en la respuesta de la inmunidad innata de los individuos es variable (Guzman, M. et. al., 2016; Romero-Hidalgo, S. et. al, 2017), lo que puede desencadenar la selección de variantes de *Flavivirus* con mayor *fitness* e influenciar la continua distribución de DENV y ZIKV o la manifestación de enfermedades más severas en el territorio mexicano. Con el fin de evaluar la capacidad de evasión de los *Flavivirus* seleccionados en poblaciones mexicanas de zonas endémicas de México, se utilizaron modelos celulares para evaluar el fenotipo evasor de IFN-1.

Inicialmente, las muestras sanguíneas obtenidas (**Tabla 1**) no aseguraban la presencia de *Flavivirus* ya que, a pesar de contar con el diagnóstico mediante ELISA, la falta de identificación de anticuerpos IgM contra DENV o resultados ubicados en zonas grises, no proporcionaron diagnóstico contundente o diferencial. Se ha reportado una alta homología entre especies de *Flavivirus* como DENV y ZIKV, por lo que pueden generarse reacciones cruzadas que no permitan la identificación del *Flavivirus* causal (Priyamvada, Lalita; et. al., 2016). A pesar de que la NOM-032-SSA-2014 recomienda el diagnóstico de *Flavivirus*

mediante ELISA para IgG, en su mayoría, esto no representa una infección activa sino una fase de convalecencia o infecciones secundarias, por lo que la presencia de partículas virales en circulación sería mínima (Guzman, M. et. al., 2016). En adición, un factor importante que permitió la selección de estos pacientes, fue la sintomatología característica de infección por *Flavivirus*, aunado a que eran residentes de una zona endémica del mosquito transmisor (OMS, 2009; Secretaría de Salud, 2018). Cabe destacar que la sintomatología de infección por *Flavivirus* no es exclusiva de este género, debido a que existen signos y síntomas que son similares durante infecciones por otros virus como el chikungunya (CHIKV), caracterizando la ineficacia del uso de la presentación clínica como método único de diagnóstico (WHO, 2018). De las 9 muestras obtenidas, únicamente dos aislados, YUC-47 y YUC-96, fueron identificados como *Flavivirus* debido al reconocimiento del péptido fusogénico presente en la proteína de envoltura, observado cualitativa (**Figura 17 y 18**) y semi-cuantitativamente (**Figura 15**). El motivo por el cual solo se lograron aislar dos *Flavivirus* del total de las muestras utilizadas, pudo deberse a varios factores. Uno de ellos, pudo ser que la toma de muestra se llevó a cabo después de la etapa de viremia por lo cual la presencia de viriones en circulación pudo ser escasa o nula. Otro factor, pudo deberse a títulos iniciales muy bajos, por lo que se necesitaría continuar con los pases ciegos de las muestras aparentemente negativas, hasta detectar la presencia de *Flavivirus*. También, algunas de las muestras pudieron presentar otro virus no perteneciente al género *Flavivirus* como el *Alphavirus* CHIKV, por lo que la identificación por RT-PCR ayudaría a ubicar posibles muestras positivas a CHIKV.

A pesar de verificar la presencia de *Flavivirus*, la necesidad por identificar la especie era de gran importancia durante el estudio, debido a que los fenotipos de evasión de la respuesta inmunológica serían comparados con el virus referencia correspondiente. Pese a la realización de RT-PCR, la tipificación de los aislados fue inconclusa (**Figura 16**) debido a la ausencia de amplificaciones con los oligonucleótidos para identificar a ZIKV y DENV. Sin embargo, la banda correspondiente a ZIKV PR demuestra que los oligonucleótidos lograron reconocer al control positivo, mostrando efectividad en la unión y reconocimiento del genoma; la ausencia de amplificaciones de los aislados con los mismos oligonucleótidos, demostraron que los *Flavivirus* en cuestión no eran ZIKV. Por otro lado, los oligonucleótidos

utilizados para la identificación de DENV, no se unieron a ninguno de los aislados y tampoco al control positivo DENV-1 WP. Los oligonucleótidos utilizados para tipificar DENV, son los mismos utilizados por Lanciotti y colaboradores en 1992, lo que sugiere que, debido al tiempo y a que los oligonucleótidos fueron desarrollados a partir de secuencias de virus de diferentes zonas geográficas, los aislados tipificados en el laboratorio, así como el DENV referencia, han tenido cambios o mutaciones en su genoma que no permitieron el reconocimiento por los oligonucleótidos utilizados (Selisko, B. et al., 2018). Se consideró la posibilidad de que los aislados pertenecieran a otra especie de *Flavivirus*, sin embargo, de acuerdo con los reportes epidemiológicos de la Secretaría de Salud, en el año 2016 la incidencia de infecciones por *Flavivirus* era primordialmente por DENV y no se reportó ninguna infección por WNV (Secretaría de Salud, 2016). Además, la morfología de las PFUs durante las titulaciones por inmunocitoquímica (Figura 15) coincidía con aquella de DENV-1 WP y difería de las PFUs generadas por ZIKV PR. Debido a esto existe una alta probabilidad de que ambos aislados sean DENV, pero se pretende diseñar nuevos oligonucleótidos basados en secuencias de DENV mexicanos o llevar a cabo una secuenciación masiva con la intención de confirmar la tipificación.

Se ha demostrado que DENV y WNV son capaces de establecer infecciones productivas sin importar la estimulación de la respuesta por IFN-1 (Bustos-Arriga, et al., 2011; Keller, BC, et al, 2006), lo cual ha sido asociado a un aumento de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Con el propósito de conocer la capacidad de evasión de la respuesta antiviral, los aislados mexicanos, presuntamente DENV, fueron evaluados ante la respuesta de IFN-1. Se observó que en ausencia de IFN-1 endógenos (células Vero), YUC-47 y YUC-96 establecieron infecciones muy productivas que llegaron a alcanzar títulos por arriba de 8 Log durante toda la cinética de infección, y durante los primeros 4 días post infección, respectivamente. Dichos títulos se redujeron al someter a los virus a concentraciones elevadas de IFN-1 endógenos, disminuyendo de títulos de máxima infección (en células Vero) a títulos entre $7 \leq \text{Log} \leq 7.8$ para YUC-47, y de 8.2 que fue disminuyendo progresivamente hasta 4.5 para YUC-96 (Cheol L.G., 2006) (Figura 19). Esto demuestra que en presencia de IFN-1, los virus no fueron capaces de llevar a cabo una replicación tan productiva como en las células Vero, observado por la disminución de aproximadamente 10

veces para YUC-47 y más de 100 veces para YUC-96 del título viral. Sin embargo, a pesar de que los IFN-1 endógenos sometieron a YUC-47 y YUC-96 a una presión antiviral, ambos aislados demostraron sobrepasar las respuestas de IFN-1 en fibroblastos humanos (HHF-1) durante la cinética de infección, fenotipo que se asemeja al descrito por Bustos-Arriaga, J y colaboradores (2011). Esto sugiere, que si bien, YUC-47 y YUC-96 no mantienen títulos iguales en ausencia de IFN-1 como en presencia de IFN-1, si mantienen un fenotipo evasor que varía en intensidad.

Al comparar las reducciones del porcentaje de infección, se observó una mayor tasa de infección por ambos aislados en el día 1 post infección, e incluso más que DENV-1 WP (**Figura 21 y Figura 22**). La capacidad de replicación elevada dentro de las primeras horas de infección se ha descrito en variantes de WNV y DENV, lo que sugiere que YUC-47 y YUC-96 pueden evadir la respuesta inmunológica innata varias horas después de iniciada la infección, permitiéndoles diseminarse más rápido a células vecinas y acumular proteínas virales capaces de bloquear las señales como JAK/STAT (Muñoz-Jordán, J.L., 2010).

Al observar los patrones de infección de YUC-47, se muestra que es capaz de mantener infecciones, debido a la constante presencia de títulos altos en células Vero y ligeramente disminuidos en células HHF-1 (**Figura 21**). Sin embargo, YUC-96 mantiene un fenotipo muy similar al de DENV-1 WP, debido a que a partir del día tres, los títulos disminuyeron notablemente para ambos (**Figura 22**). Estos datos indican, que existen diferencias en el fenotipo de evasión de cada aislado, pero el monitoreo de las monocapas infectadas durante la cinética de infección, reveló que YUC-96 y DENV-1 WP provocaron daño celular significativo, a diferencia de YUC-47, aislado que mostró mantener la integridad celular por más tiempo (**Figura 20**). Este es un factor clave para comprender la forma en que los aislados son capaces de evadir la respuesta de IFN-1 en modelos celulares, sugiriendo que YUC-47 es capaz de evadir la respuesta de IFN-1 y mantener a las células vivas para permitir más ciclos de replicación, que se vieron reflejados en los altos títulos observados durante la cinética. Al contrario, YUC-96 muestra un comportamiento más agresivo con un nivel de replicación comparable a DENV-1 WP que, aunque capaces de evadir la respuesta de IFN-1 con títulos altos, producen elevado efecto citopático que pueden ser la razón de la

disminución del título viral después del día 3 post infección. Se sabe que DENV-1 WP presenta un fenotipo de virulencia agresivo con una tasa elevada de replicación en diversos tipos celulares (Whitehead, S. et. al, 2003), a lo que se le ha atribuido la acumulación de grandes cantidades de sfRNA en células humanas (Bustos-Arriaga, et. al. 2018), uno de los mecanismos de evasión de la respuesta a IFN-1 más eficiente entre *Flavivirus*, lo que sugiere que el comportamiento similar de YUC-96 al de DENV-1 WP podría deberse al mismo mecanismo. Existen reportes de la variabilidad de mecanismos de citotoxicidad que los *Flavivirus* inducen en las células infectadas, como la apoptosis mediada por sfRNA (Liu, Y. et al., 2014). En el caso de YUC-47, la conservación celular pudo deberse a procesos de autofagia, ya que se ha reportado que variantes de DENV, utilizan este proceso celular como mecanismo para incrementar significativamente la replicación viral y aumentar la liberación de viriones al medio extracelular para así continuar con más ciclos de replicación. (Guabiraba, R. & Ryffel, B., 2013). De esta forma, tanto YUC-47 como YUC-96 muestran la capacidad de evadir la respuesta de IFN-1 endógenos, sin embargo esta capacidad va acompañada de fenotipos de evasión distintos, los cuales podrían relacionarse con mecanismos de sobrevivencia celular (autofagia) o mecanismos de citotoxicidad (apoptosis), respectivamente, para permitirle al virus montar infecciones prolongadas y/o inicialmente efectivas. Además, estos datos muestran la variabilidad que existe entre los aislados seleccionados en una zona endémica mexicana específica, e incluso como estos *Flavivirus*, difieren en sus fenotipos de evasión a pesar de pertenecer al mismo brote 2016.

A pesar de que en su mayoría las diferencias en la reducción de la infección no mostraron diferencias estadísticamente significativas, cada aislado evaluado, mostró fenotipos distintos para mantener infecciones productivas, que probablemente les proporcionaron la capacidad de evadir la respuesta de IFN-1. Al observar el origen de las muestras clínicas (**Tabla 1**), estas provienen de dos pacientes con características distintas, lo que sugiere que el fenotipo de evasión de YUC-47 y YUC-96, varía de acuerdo a las presiones de selección a las que fueron sometidos durante la infección a su hospedero. Además, se ha observado que existe una asociación entre la capacidad de evasión de la respuesta inmunológica y la gravedad de la enfermedad que se presenta (Muñoz-Jordán, J.L., 2010), probablemente por el grado de daño celular, mecanismos que promueven la diseminación viral o la exacerbación de las

respuestas antivirales e inflamatorias. Aunado a esto, la capacidad de YUC-47 de mantener la integridad celular, implica que exista una mayor cantidad de reservorios celulares en el hospedero, lo que podría aumentar el riesgo de transmisión por vector. Se requiere el estudio detallado de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria innata establecida por los aislados obtenidos así como la caracterización cuantitativa del fenotipo de evasión de IFN-1.

10. Conclusiones

El estudio para evaluar la capacidad de evasión de la respuesta de IFN-1, proporcionó información esencial para comprender el comportamiento y la capacidad infecciosa que presentan los aislados mexicanos. Fue posible demostrar que los aislados mexicanos circulantes durante el periodo 2016 poseen capacidad de evadir las respuestas antivirales probablemente por diferentes mecanismos, llegando a niveles comparables de virus previamente reportados como buenos evasores de la respuesta de IFN-1 (DENV1 WP). Tanto YUC-47 como YUC-96, mostraron distintos fenotipos evasores, evidenciados por la diferencia en la severidad de los efectos citotóxicos que producen a nivel celular, los cuales podrían depender de la diferencia en los mecanismos de evasión utilizados por cada virus. Por lo cual, se sugiere comenzar con estudios que permitan conocer más a fondo los mecanismos por los cuales los aislados mexicanos pueden evadir la respuesta inmunológica innata y permitir en un futuro, relacionar dichos mecanismos de evasión con la severidad de la enfermedad que producen y/o su distribución en las zonas geográficas endémicas de México.

Gracias a la evaluación del fenotipo evasor de IFN-1 de los aislados mexicanos, se demostró la importancia de caracterizar a nivel de virulencia a los *Flavivirus* endémicos de México, y no solo limitarse a la tipificación e identificación de ellos, ya que la adaptación a presiones evolutivas como la respuesta inmunológica de la población mexicana, no puede compararse con aquella de otras zonas geográficas del mundo, e incluso permite evaluar la variabilidad que existe en el fenotipo evasor y la virulencia entre *Flavivirus* mexicanos de una misma región y periodo de brote. Por lo cual, se propone que se continúe con la ampliación del banco de aislados mexicanos, que sirvan como referencia para posteriores

estudios y como medida epidemiológica indispensable, para evaluar la virulencia de las variantes de *Flavivirus* seleccionados en zonas endémicas de México.

11. Perspectivas

Evaluar el banco de aislados generados en el Laboratorio de Biología molecular e inmunología de arbovirus a nivel de virulencia en respuesta a IFN-1, para comprender la relación que existe entre las variantes con mejores adaptaciones, la zona geográfica en la que se seleccionan y la severidad de las enfermedades que producen. Estudiar los mecanismos moleculares por los cuales las variantes de *Flavivirus* mexicanos son capaces de evadir la respuesta inmune innata, iniciando los estudios sobre la acción de sRNA y su relación con los aislados con mejor fenotipo de evasión de IFN-1.

12. Referencias

- Akiyama, Benjamin M.; et al. (2016). Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science Reports*. 354(6316): 1148-1152.
- Apte-Sengupta, S.; Sihori, D.; Kuhn, R. (2014). Coupling of Replication and Assembly in Flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* PMC. 0:134-142.
- Barbi, L.; Campos Coelho, A.V; Arraes de Alencar, L. C; Crovella, S. (2018). Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. *Braz. Infect. Dis.* 22(2):137-141.
- Beaver, J. T., Lelutiu, N., Habib, R., & Skountzou, I. (2018). Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front. Immunol.* 9:1-17.
- Bollati, Michela, et. al. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 87(2): 125–148.
- Bustos Arriaga, J. et al. (2018). Decreased accumulation of subgenomic RNA in human cells infected with vaccine candidate DEN430 increases viral susceptibility to type I interferon. *Vaccine.* 36:3460-3467.

- Bustos-Arriaga, J., García-Machorro, J., León-Juárez, M., García-Cordero, J., Santos-Argumedo, L., Flores-Romo, L. Cedillo-Barrón, L. (2011). Activation of the innate immune response against dengue in normal non-transformed human fibroblasts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12): 1-13.
- Bustos-Arriaga, J., Mita-Mendoza, N. K., Lopez-Gonzalez, M., García-Cordero, J., Juárez-Delgado, F. J., Gromowski, G. D., Cedillo-Barrón, L., et. al. (2015). Soluble mediators produced by the crosstalk between microvascular endothelial cells and dengue-infected primary dermal fibroblasts inhibit dengue virus replication and increase leukocyte transmigration. *Immunologic Research*. 64(2): 392–403.
- Calvez, Elocie; et. al. (2018). Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. *Emerging Microbes & Infections*. 7(159):1-10.
- Carpio-Orantes, L. (s.f). Virus Zika, Linaje Americano?. Research gate. Consultado el 30 de abril de 2019 en: https://www.researchgate.net/profile/Luis_Del_Carpio-Orantes/publication/319463381_Virus_Zika_Linaje_Americano/links/59acbe53458515d09cd8acc8/Virus-Zika-Linaje-Americano.pdf.
- Cegolon, L.; Heymann, WC.; Lange, J. (2018). Comment on: Definitive test for dengue fever: when and which should I use?. *Singapore Med J*. 59(3):165
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Chikungunya Virus. [en línea]. Consultado el 20 de abril de 2019 en: <https://www.cdc.gov/chikungunya/index.html>.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Zika and Microcephaly. [en línea]. Consultado el 10 de mayo de 2019 en: https://www.cdc.gov/zika/healtheffects/birth_defects.html.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Zika virus: diagnostic tests <https://www.cdc.gov/zika/laboratories/types-of-tests.html>.
- Cedillo-Barrón, L.; et. al. (2018). Chapter 17: The Role of Flaviviral Proteins in the Induction of Innate Immunity. *Virus Protein and Nucleoprotein Complexes, Subcellular Biochemistry*. Singapore. Springer Nature. 407- 442.
- Chan, Y.K; Gack, M.U. (2016). A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize innate immunity. *Nature Immunol*. 17:523-530.
- Cheol Lee, G., Yi, H. A., & Lee, C. H. (2006). Stimulation of interferon- β gene expression by human cytomegalovirus via nuclear factor kappa B and phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Virus Research*, 117(2), 209–214.

- Chew, T., Noyce, R., Collins, S. E., Hancock, M. H., & Mossman, K. L. (2009). Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Molecular Immunology*. 46(3):393–399.
- Choksupmanee O, Hodge K, Katzenmeier G, Chinnaronk S. (2012). Structural platform for the autolytic activity of an intact NS2B-NS3 protease complex from dengue virus. *Biochemistry*. 51(13):2840–2851
- Crabtree MB, Kinney RM, Miller, BR. (2005). Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol*. 150(4):771– 786.
- Dai, J.; Pan, W.; Wang, P. (2011). ISG15 facilitates cellular antiviral response to dengue and west nile virus infection in vitro. *Virol J*. 8(468):1-6.
- Dentzer, Thomas G.; Ivo C. Lorenz; Matthew J. Evans; and Charles M. Rice¹. (2009). Determinants of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 Protease Domain Required for Production of Infectious Virus. *Journal of Virology*. 83(24): 12702–12713.
- Diamond, M.S; Farzan, M. (2013). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol*. 13(1):46-57.
- Dowd, Kimberly A.; et. al. (2016). Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell Rep*. 16(6):1485-1491.
- Duffy, S. (2018). Why are RNA virus mutation rates so damn high?. *PLoS Biology*. 16(8):1-6.
- Fan, Jingjing; Liu, Yi; Yuan, Zhiming Yuan. (2014). Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. *Virologica sinica*. 29(3):162-169.
- Filomatori, C. V., Carballeda, J. M., Villordo, S. M., Aguirre, S., Pallarés, H. M., Maestre, A. M. Gamarnik, A. V., et. al (2017). Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS Pathogens*, 13(3):1–23.
- Fried JR, et al. (2010). Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(3):617.
- Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, et al. (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*.292:162-168.
- Gerold G, Bruening J, Weigel B, Pietschmann T (2017). Protein interactions during the Flavivirus and Hepacivirus life cycle. *Mol Cell Proteomics* 16(4 suppl 1):S75–S91
- Gómez Legorreta, Cristina. (2019). Tesis de licenciatura. UNAM

- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology*. 81(10):2341–64.
- Goubau, D.; Deddouche, S.; Reis e Sousa, C. (2013). Cytosolic Sensing of Viruses. *Immunity*. 38(5):855-869.
- Grant A., Ponia SS., Tripathi, S., et. al. (2016). Zika virus targets human STAT2 to inhibit type 1 interferon signaling. *Cell Host Microbe*. 19:882-890.
- Guo, H.-Y., Zhang, X.-C., & Jia, R.-Y. (2018). Toll-Like Receptors and RIG-I-Like Receptors Play Important Roles in Resisting Flavivirus. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/6106582>.
- Guzman, Maria G., et. al. (2016). Dengue infection. *Nature: Disease Primers*. 2:1-25.
- Halstead, Scott B. (s.f). Dengue: Overview and History. Consultado el 30 de abril de 2019 en: http://media.axon.es/pdf/82400_2.pdf.
- Helbig, KJ. et. al. (2013). Viperin is induced following dengue virus type 2 infection and has anti.viral actions requiring the C-terminal end of viperin. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(4):2178.
- Hsieh, S. C., Wu, Y. C., Zou, G., Nerurkar, V. R., Shi, P. Y. & Wang, W. K. (2014). Highly conserved residues in the helical domain of dengue virus type 1 precursor membrane protein are involved in assembly, precursor membrane (prM) protein cleavage, and entry. *J Biol Chem* 289:33149–33160.
- Ivashkiv, Lionel B., Donlin, Laura T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*. 14(1):36-49.
- Kell, Alison M.; Gale, Michael Jr. (2015). RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 479-480:110-121.
- Keller, B.C.; Fredericksen, B.L.; Samuel, M.A.; Mock, R.E.; Mason, P.W.; Diamond, M.S.; Gale, M., Jr. (2006). Resistance to alpha/beta interferon is a determinant of West Nile virus replication fitness and virulence. *J. Virol*. 80:9424–9434.
- Lanciotti, R., et al. (1992). Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Jour Clin Microbio*. 30(3):545–551.
- Laurent-Rolle, M; et. al. (2010). TThe NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferón-mediated JAK-STAT signaling. *Jour. Virology*. 84:3503-3515.
- Lester, S. N., & Li, K. (2014). Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *Journal of Molecular Biology*, 426(6), 1246–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.024>

- Li Y, Modis Y. (2014). A novel membrane fusion protein family in Flaviviridae? *Trends Microbiol* 22:176–182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.008>.
- Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, Ge J, Wang S, Goldman SA, Zlokovic BV, Zhao Z, Jung JU (2016). Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR Signaling in human Fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell*. 19(5):663–671.
- Lindenbach, B.D.; Rice, C.M. (2003). *Molecular biology of flaviviruses*. *Adv. Virus Res.* 59:23–61.
- Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J. & Rice, C. M. (2007). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. *Fields Virology*, 5th. 1101–1152. Philadelphia. Lippincott-Raven 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*. 448:15-25.
- Mackenzie JM; Khromykh AA.; Jones MK; Westaway EG. (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 245:203-215.
- Manokaran, G.; et. al. (Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferón expression for epidemiological fitness (2015). *Science Reports*. 350(6257):217- 221.
- Martín-Acebes, M., et. al. (2018). Antibody-Dependent Enhancement and Zika: Real Threat or Phantom Menace?. *Front Cell Infect Microbiol*. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00044
- Martinez-Barragan, J. J. & del Angel, R. M. (2001). Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J. Virol.* 75:7818–7827.
- Mead PS, Duggal NK, Hook SA, Delorey M, Fischer M, Olzenak Mcguire D, et al. (2018) Zika Virus shedding in semen of symptomatic infected men. *N Engl J Med* 378:1377–1385.
- Miner, J. J., Diamond, M. S. (2018). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe*. 21(2):134–142.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 427(6972):313–319
- Mukhopadhyay, Suchetana; Kuhn, Richard J.; Rossmann, Michael G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. In *Nature Reviews Microbiology*. 3:13-22. DOI: 10.1038/nrmicro1067
- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, 98(2):192–208.

- Muñoz-Jordán, J. L., & Fredericksen, B. L. (2010). How Flaviviruses Activate and Suppress the Interferon Response. *Viruses* 2:676–691.
- Murrell, Sarah; Suh-Chin, Wu; Butler, M. (2010). Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances*. 29:239-247.
- Mustafa, M.S. (2014). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*. 71:67-70.
- Neufeldt, C.; Cortese, M.; Acosta, E.; Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Microbiology*. 16:125-142.
- Ng WC, Soto-Acosta R, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA, Ooi EE (2017). The 5' and 3' untranslated regions of the Flaviviral genome. *Virus* 9(6)
- Oliveira, Edson R.A; Mohana-Borges, R.; B. de Alencastro, R.; Horta, B. (2016). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Research*. 115-123.
- Owen, J.A; Punt, J.;Stranford, S. A. (2014). *Kuby: Inmunología*. 7a ed. China. McGrawHill.
- Patkar C.; Kuhn R. (2008). Yellow Fever Virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its enzymatic functions. *J Virology*. 82:3342-52.
- Patterson, J.; Sammon, M.; Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West Jour of Emerg Med*. 17(6):671-679
- Pettersson, J.H.; Fiz-Palacios, O. (2014). Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. *J. Gen. Virol*. 95:1969–1982.
- Powell, J. R., Gloria-Soria, A., & Kotsakiozi, P. (2018). Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. *BioScience*, 68(11), 854–860.
- Priyamvada, Lalita; et. al. (2016). Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *PNAS*. 113(28):7852-7857
- Rastogi, M.; Sharma, N.; Kumar Singh, S. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*. 13(131):1-10.
- Reis e Sousa, C. (2017). Sensing infection and tissue damage. *EMBO Molecular Medicine*, 9(3), 285–288.
- Roby, Justin A.; Setoh Xiang y.; Hall, Roy A.; Khromykh, Alexander A. (2015). Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *Journal of General Virology*. 96:1551-1559.
- Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J.; Smit, J.M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci*. 67:2773-2786.

- Romero-Hidalgo, S. et al. (2017). Demographic history and biologically relevant genetic variation of Native Mexicans inferred from whole-genome sequencing. *Nature communications*. 8(1005):1-8.
- Rothman, Alan L. (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews*. 11:432-543.
- Rush B. (1789). An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. *Med Inq Obs Philadelphia*. 1:104–117.
- Samarajiwa, S. A., Forster, S., Auchettl, K., & Hertzog, P. J. (2009). INTERFEROME : the database of interferon regulated genes. 37(November 2008), 852–857.
- Samsa, M. M., et. al. (2009). Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid. Droplets for. *Plos Pathogens*, 5(10):1-14. doi:10.1371/journal.ppat.1000632
- Samuel, M.A., et al. (2006). PKR and RNAase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J. Virol*. 80(14):7009-7019.
- Sánchez-Leyva, Marina; et. Al. (2017). Genetic Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Susceptibility to Dengue Virus Infection in a Mexican Population. *Viral Immunology*, 30(8):615–621.
- Schneemann A. (2006). The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu Rev Microbiol*. 60:51-67
- Schoggins. J.W. (2014). Interferon-stimulated genes: Roles in viral pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 6(1):40–46.
- Secretaría de Salud (2016). Boletín epidemiológico: semana 52. [en línea]. Consultado el 9 de mayo de 2019 en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>.
- Secretaría de Salud. (2018). Panorama Epidemiológico de Dengue 2018. [en línea]. Consultado el 9 de mayo de 2019 en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/425416/Pano_dengue_52_2018.pdf.
- Secretaría de Salud. (2019). Boletín epidemiológico: semana 17. [en línea]. Consultado el 9 de mayo de 2019 en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/459280/sem17.pdf>.
- Selisko, Barbara; Papageorgiou, N.; Ferron, F.; Canard, B. (2018). Structural and Functional Basis of the Fidelity of Nucleotide Selection by Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerases. *Viruses*. 10(59): 1-24.

- Shrivastava G, García-Cordero J, León-Juárez M, Oza G, Tapia-Ramírez J, Villegas-Sepulveda N, Cedillo-Barrón L (2017, October 3) NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. *Virulence*. 8(7):1450–1456.
- Sirohi, Devika; Chen, Zhenguo; Klose, T.; et. al. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science reports*. 352(6284):467-470. DOI: 10.1126/science.aaf5316.
- Sihori, Devika; Kuhn, Richard J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *Jour. Of Infec. Dis*. 216(S10):S935–944.
- Stettler, Karin; et- al. (2016). Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science Research Reports*. 353(6301):823-826.
- Suthar, Mehul S.; Aguirre, S.; Fernández-Sesma Ana. (2013). Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *Plos Pathogens*. 9(9):
- Szretter KJ, et al. (2011). The interferon-inducible gene viperin restricts West Nile virus pathogenesis. *J Virol*. 85:11557–11566.
- Tassaneetrithep B, Burgess T, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al.(2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*.197:823-829.
- Urosevic, Nadezda. (2003). Is flavivirus resistance interferon type-1 independent?, *immunology and Cell Biology*. 81:224-229.
- Velandia, Myriam L.; Castellanos, Jaime E. (2011). Dengue virus: structure and viral cycle. *Infectio*. 25(1):33-43.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, KrijnseLocker J, Bartenschlager R (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5(4):365–375.
- White, J. M., Whittaker, G. R. (2016). Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes. *Traffic*. 17(6):593-614.
- World Health Organization. (2019). Dengue and severe dengue. Consultado el 30 de abril de 2019 en: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- World Health Organization. (2018). Zika virus. Consultado el 30 de abril de 2019 en: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>.
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A., Shi, P. Y. et. al. (2018). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications*, 9(414):1-13.

- Yu, I. M., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. & Chen, J. (2009). Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol.* 83:12101–12107
- Zhang, X.; et. al. (2015). Structure of acidic pH dengue virus showing the fusogenic glycoprotein trimers. *Journal of Virology.* 89:743-750.
- Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG (2004). Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* 12(9):1607–1618
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., Baker, T. S., Strauss, J. H., Kuhn, R. J. & Rossmann, M. G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* 22, 2604– 2613
- Zhang, Y., Kaufmann, B., Chipman, P. R., Kuhn, R. J. & Rossmann, M. G. (2007a). Structure of immature West Nile virus. *J Virol* 81, 6141–6145.
- Zheng, S., et. al. (2016). Porcine 2', 5'-oligoadenylate synthetases inhibit Japanese encephalitis virus replication in vitro. *J. Med. Virol.* 88:760-768.
- Zou, J. et. al. (2015). Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *J. Virology.* 89(7):3455-70.

13. Anexos

A1. Morfología celular de células Vero a diferentes confluencias

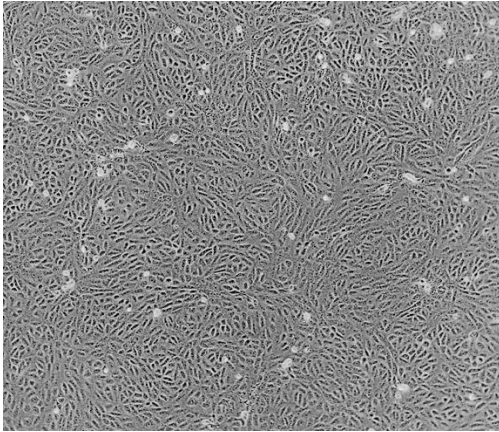


Figura A1.1 Monocapa de células Vero en óptimas condiciones, 100% confluyente. Celularidad muy abundante, compacta y sin espacios evidentes

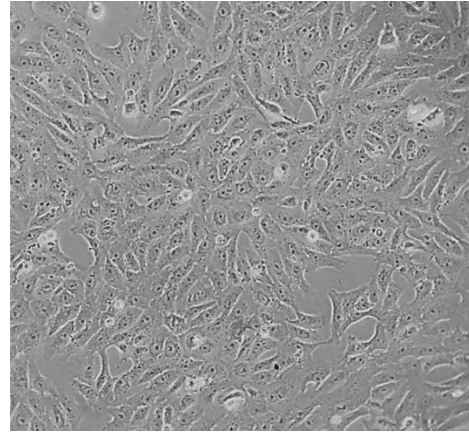


Figura A1.1 Monocapa de células Vero en óptimas condiciones, 80% confluyente. Existen espacios entre células y éstas tienen una superficie más amplia.

A2. Parámetros de morfología celular indicativos de efecto citopático resultante a infección por flavivirus en células Vero

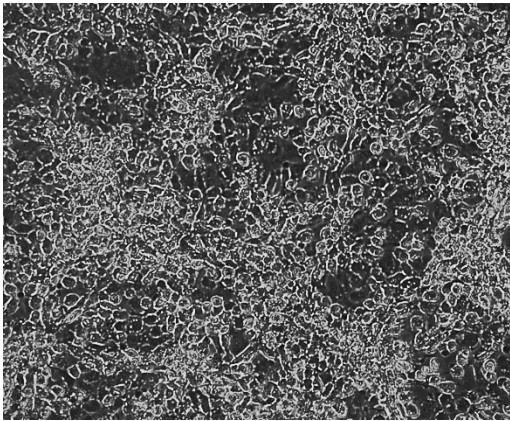


Figura A2.1 Desprendimiento celular debido a infección por flavivirus, gran parte de la monocapa es discontinua y se observan las células flotando (verde brillante)

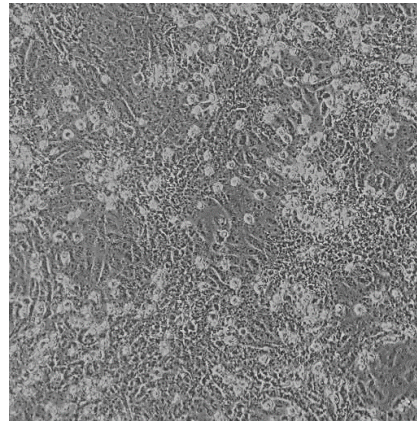


Figura A2.2 Morfología anormal de la monocapa. Células con irregularidad, protuberancias, adelgazamiento y alargamiento de la membrana. No existe consistencia en la forma y distribución celular

A3. Morfología celular de células HFF-1

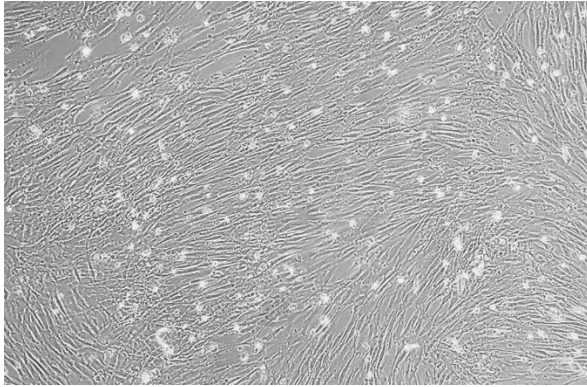


Figura A3.1 Morfología normal de células HFF-1. Células alargadas, en forma de alfiler, delgadas y estrechamente unidas. Monocapa con confluencia aproximada de 90%. Las células HFF-1 producen productos de desecho que en ocasiones es posible observados en monocapas sanas.

A4. Parámetros de morfología celular indicativos de efecto citopático resultante a infección por flavivirus en células HFF-1

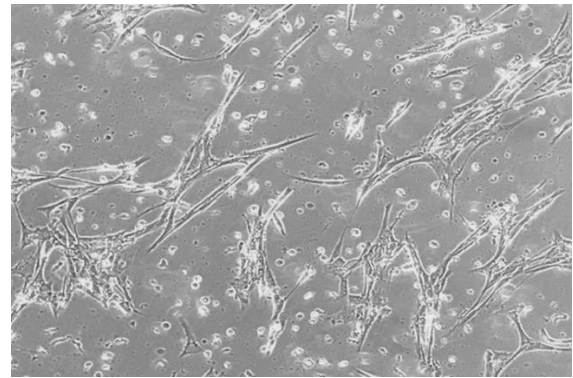


Figura A4.1 Morfología anormal de células HFF-1. Células con prolongaciones citoplasmáticas anormales, no existen uniones estrechas y la celularidad es deficiente. La monocapa se ve interrumpida, hay presencia de muerte celular y una aumentada cantidad de artefactos, desechos y/o restos celulares.

A4. Titulación de los sobrenadantes de la cinética de infección de 6 días

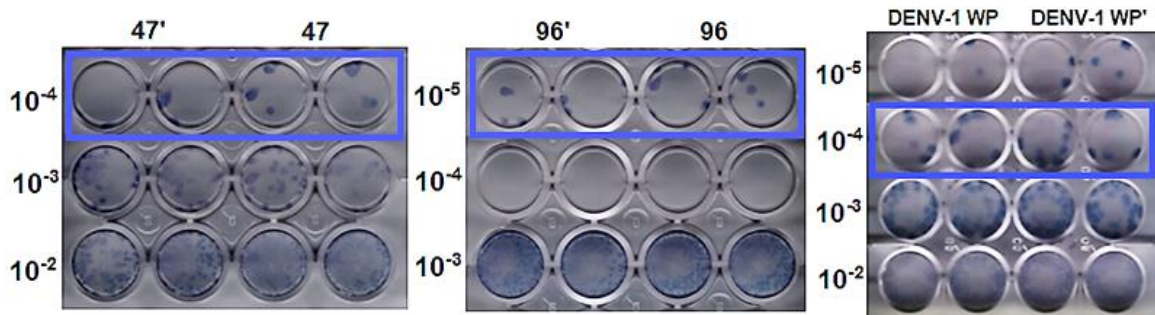


Figura A4.1 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 1 día post infección en células Vero. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

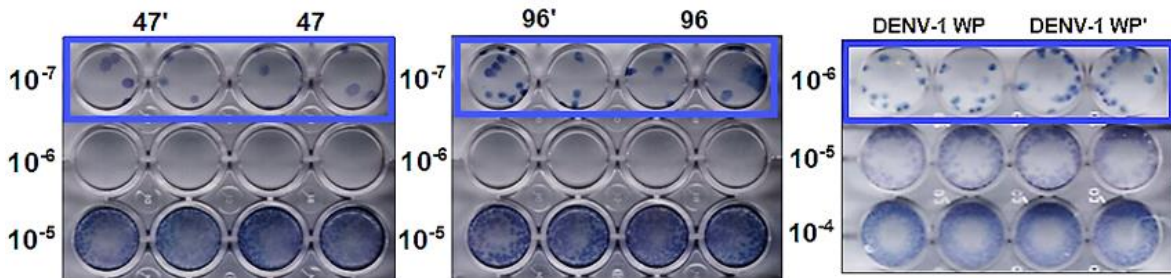


Figura A4.2 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 2 días post infección en células Vero. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

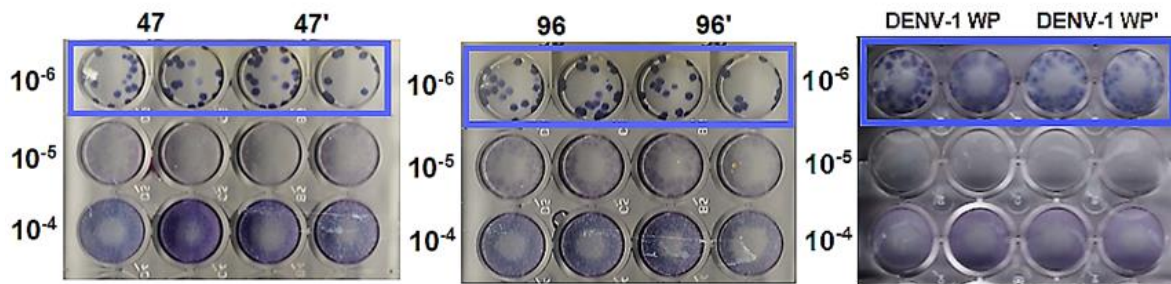


Figura A4.3 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 3 días post infección en células Vero. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

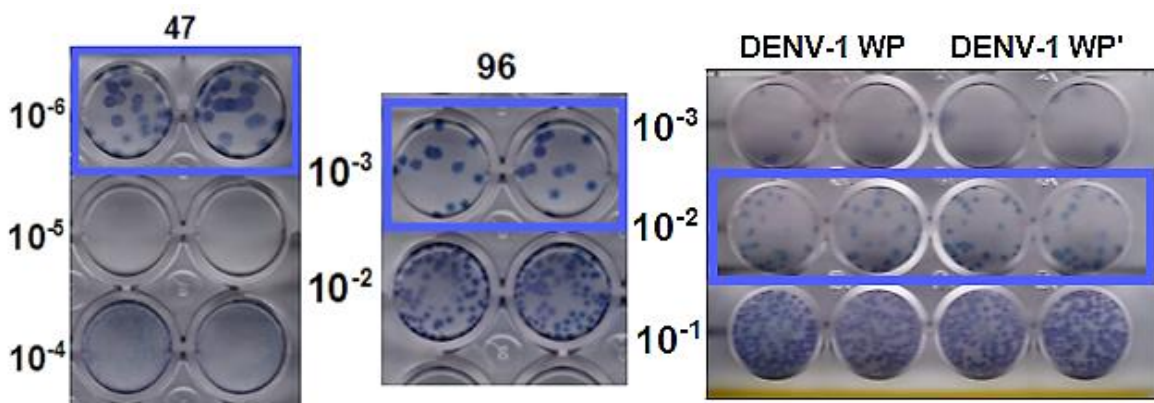


Figura A4.4 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 4 días post infección en células Vero. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

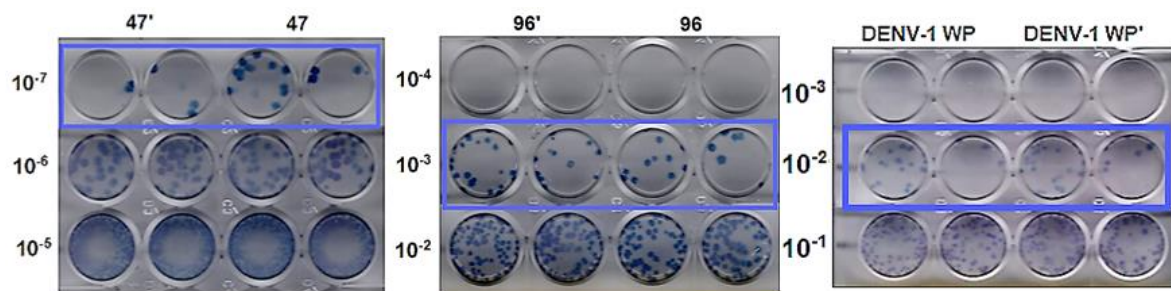


Figura A4.5 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 5 días post infección en células Vero. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

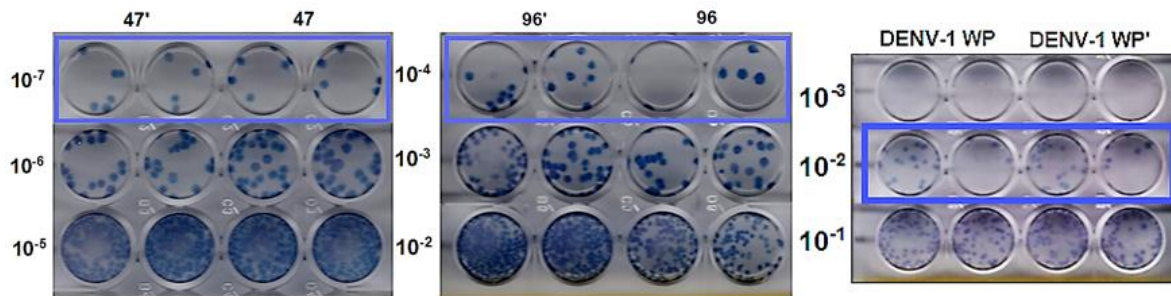


Figura A4.6 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 6 días post infección en células Vero. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

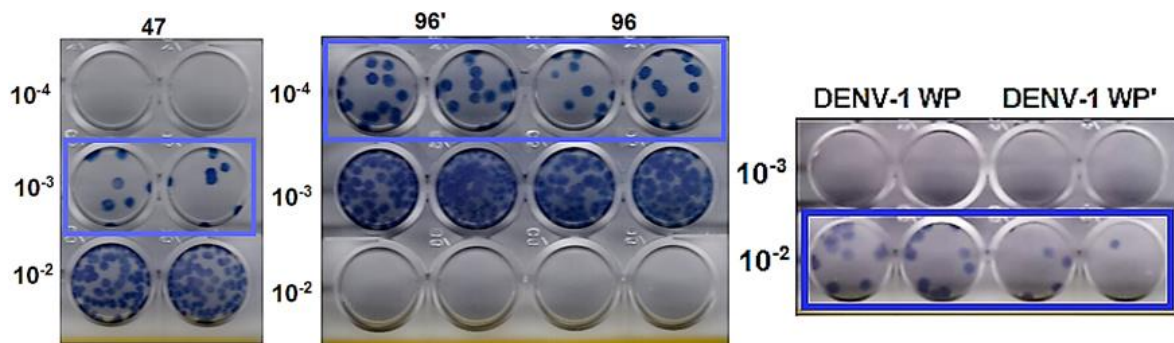


Figura A4.7 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 1 día post infección en células HFF-1. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

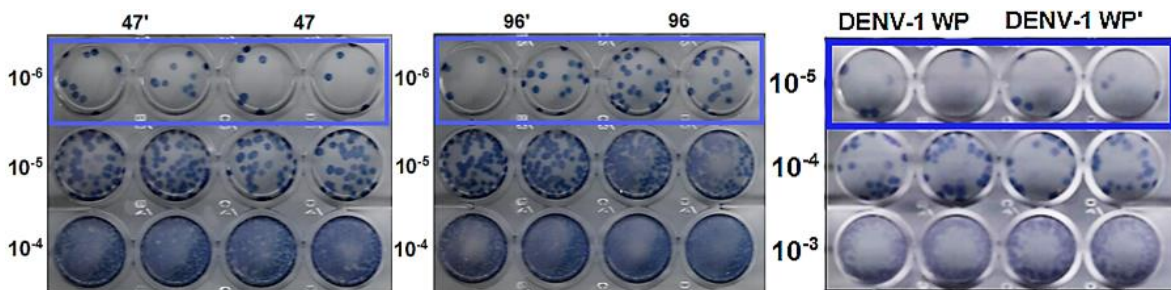


Figura A4.8 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 2 días post infección en células HFF-1. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

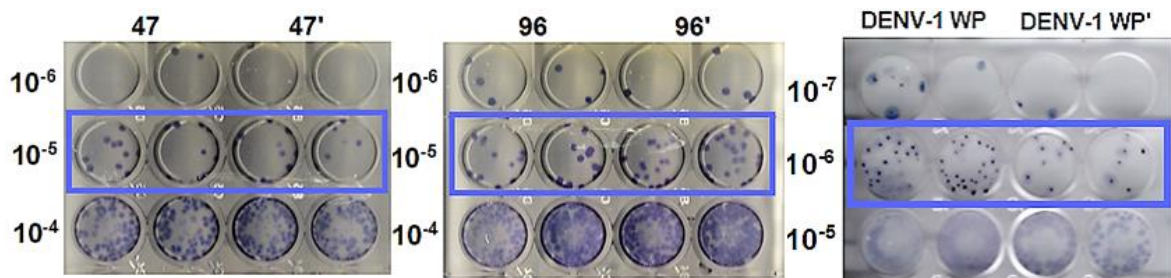


Figura A4.9 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 3 días post infección en células HFF-1. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

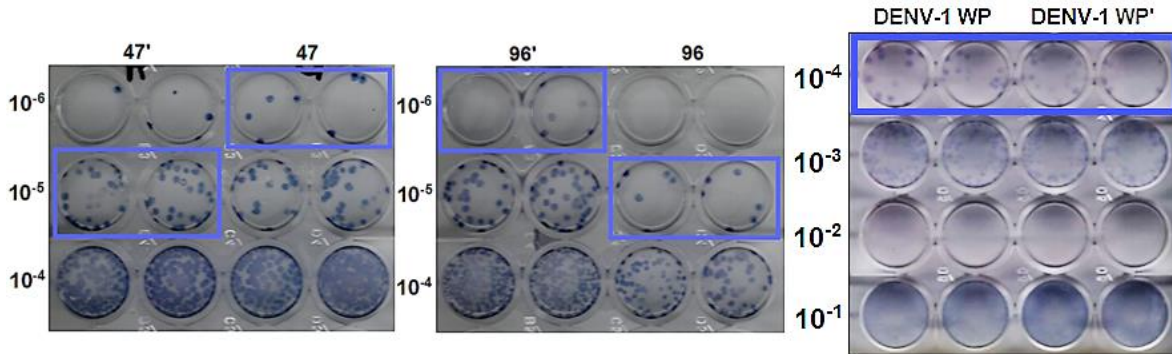


Figura A4.10 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 4 días post infección en células HFF-1. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

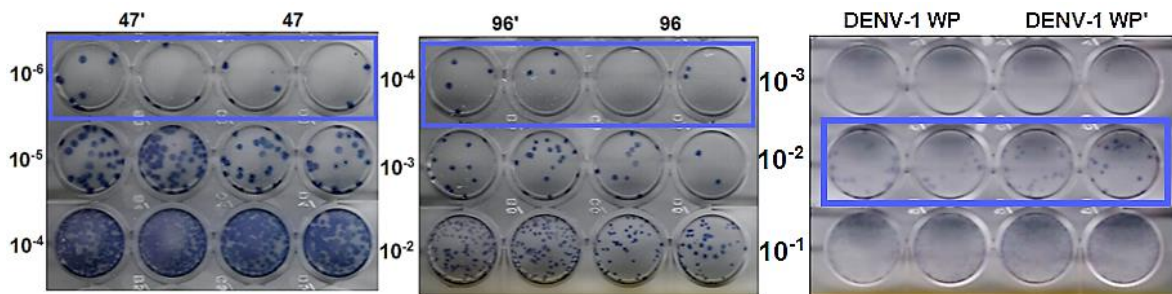


Figura A4.11 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 5 días post infección en células HFF-1. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

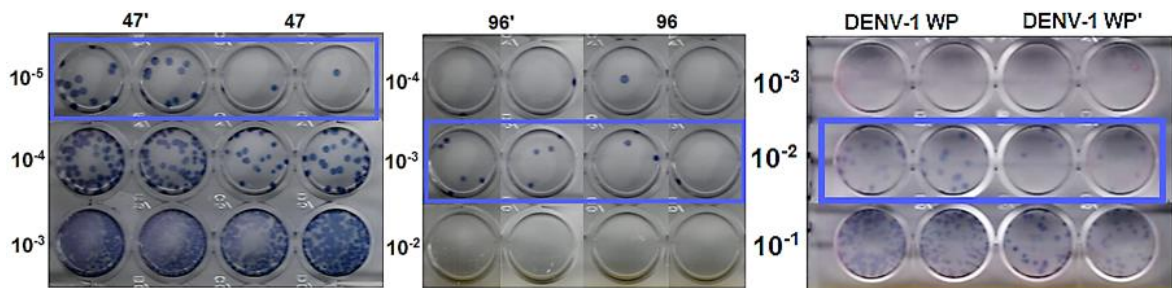


Figura A4.12 Unidades Formadoras de Placas de la muestra YUC 47, YUC 96, DENV-1 WP y sus duplicados correspondientes a 6 días post infección en células HFF-1. El recuadro azul define las diluciones en las que se contaron las PFU.

A5. Imágenes adicionales de inmunofluorescencia indirecta de los aislados y DENV-1

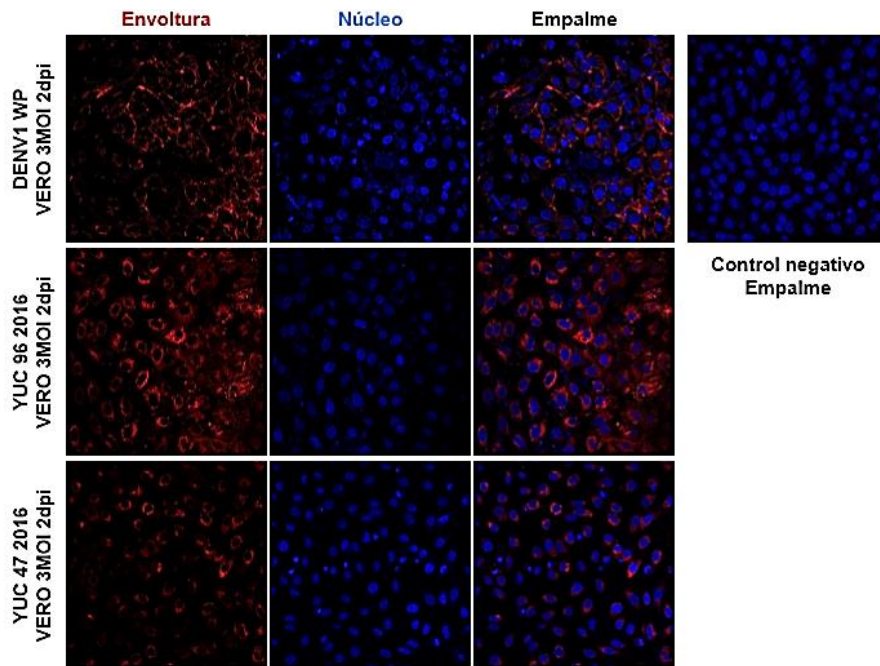


Figura A5.1 Imágenes correspondientes a la inmunofluorescencia indirecta de células Vero infectadas con las muestras YUC-47, YUC-96 y DENV-1 WP. Fluorescencia rojo indica presencia de proteína E reconocida por el anticuerpo 4G2 pan-Flavivirus. El núcleo contrasta en azul por el uso de DAPI.

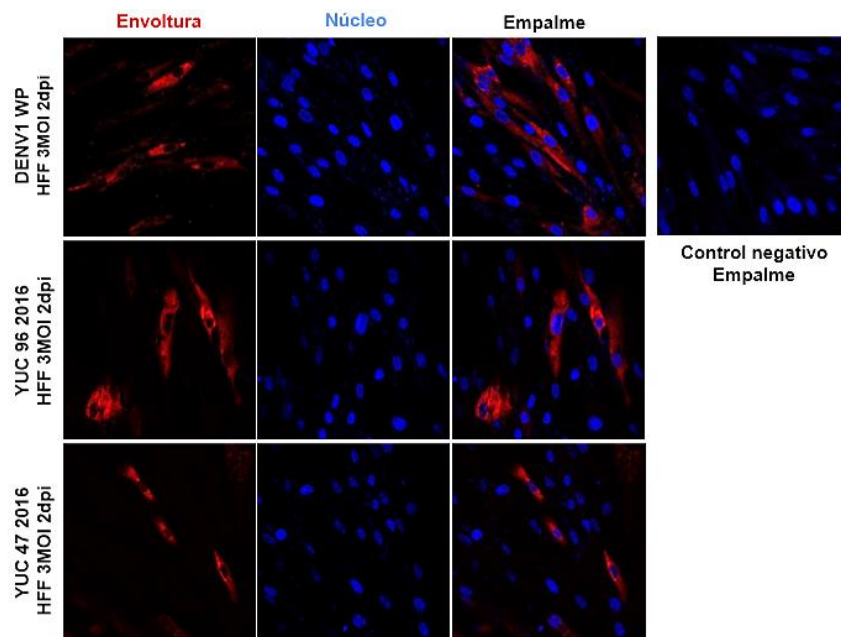


Figura A5.2 Imágenes correspondientes a la inmunofluorescencia indirecta de células HFF-1 infectadas con las muestras YUC-47, YUC-96 y DENV-1 WP. Fluorescencia rojo indica presencia de proteína E reconocida por el anticuerpo 4G2 pan-Flavivirus. El núcleo contrasta en azul por el uso de DAPI.