



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A IFNs-I DE AISLADOS
DE FLAVIVIRUS CIRCULANTES DURANTE EL BROTE DE 2019 EN
OAXACA, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VALERIA MARTÍNEZ TORRES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ BUSTOS ARRIAGA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE, 2022



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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A IFNs-I DE AISLADOS
DE FLAVIVIRUS CIRCULANTES DURANTE EL BROTE DE 2019 EN
OAXACA, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VALERIA MARTÍNEZ TORRES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ BUSTOS ARRIAGA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/783/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de junio de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biomedicina)** de la estudiante **MARTÍNEZ TORRES VALERIA** con número de cuenta **312241005** con la tesis titulada **“Caracterización de la sensibilidad a IFNs-I de aislados de *Flavivirus* circulantes durante el brote de 2019 en Oaxaca, México.”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ BUSTOS ARRIAGA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. MOISÉS LEÓN JUÁREZ
Vocal: DR. CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ
Vocal: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO
Vocal: DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
Secretario: DRA. ALMA DELIA CAMPOS PARRA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 06 de septiembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme la oportunidad y los elementos para formarme como investigadora.

A la UNAM en general por toda mi formación, desde el nivel medio superior hasta el posgrado, siempre fomentando en mí un carácter de responsabilidad, compromiso y mi mejor desempeño en mis actividades.

Al CONACYT por la beca que me permitió desarrollar mi investigación de Maestría con dedicación de tiempo completo. El siguiente proyecto fue realizado con el apoyo financiero de PAPIIT, DGAPA, UNAM proyectos: IN200821, IA209017, IA204119 y al Programa de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, CONACYT con el proyecto PN2029.

A mi tutor principal el Dr. José Bustos Arriaga, y los miembros de mi comité tutor: la Dra. Alma Delia Campos Parra y el Dr. Federico Ávila Moreno, por su asesoría y acompañamiento durante estos años de Maestría.

*Un enorme agradecimiento
a todos los que estuvieron en este proceso,
porque aprendí de ustedes
personal, académica y profesionalmente
y sobre todo, aprendí de mí misma*

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>FLAVIVIRUS</i>	5
CURSO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD Y PATOGÉNESIS DEL DENGUE Y ZIKA	7
<i>Enfermedad del dengue</i>	7
<i>Enfermedad del Zika</i>	9
<i>Diagnóstico de la enfermedad del dengue y Zika</i>	10
PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE DENGUE Y ZIKA EN MÉXICO	11
<i>Panorama epidemiológico de DENV</i>	11
<i>Panorama epidemiológico de ZIKV</i>	13
ESTRUCTURA DE LA PARTÍCULA FLAVIVIRAL	14
<i>Características y funciones de las proteínas virales</i>	14
<i>Características estructurales del genoma flaviviral</i>	19
CICLO DE REPLICACIÓN FLAVIVIRAL	23
<i>Reconocimiento y entrada celular</i>	23
<i>Desencapsidación</i>	24
<i>Traducción de la poliproteína viral</i>	25
<i>Replicación del genoma viral en el complejo de replicación</i>	26
<i>Ensamblaje de la partícula viral</i>	27
<i>Maduración y liberación de la partícula viral</i>	28
RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA CONTRA <i>FLAVIVIRUS</i>	30
<i>Interferones de tipo I (IFNs-I)</i>	32
EVASIÓN DE LA RESPUESTA INNATA ANTIVIRAL POR <i>FLAVIVIRUS</i>	35
DIVERSIDAD GENÉTICA EN VIRUS DE RNA	37
<i>Hipótesis de cuasiespecies en virus de RNA</i>	37
VARIABILIDAD GENÉTICA DEL HOSPEDERO HUMANO	39
ANTECEDENTES DIRECTOS	43
JUSTIFICACIÓN	44
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46
LÍNEAS CELULARES	46
MUESTRAS CLÍNICAS	47
AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO VIRAL	48
TITULACIÓN VIRAL POR UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (PFUs) 49	
COMPARACIÓN DEL FENOTIPO EVASOR DE IFNs-I ENTRE AISLADOS MEXICANOS DE <i>FLAVIVIRUS</i>	51
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
RESULTADOS	53
OBTENCIÓN DE AISLADOS MEXICANOS FLAVIVIRALES	53
CINÉTICA DE REPLICACIÓN DE AISLADOS FLAVIVIRALES OAXACA 2019	57

FENOTIPO EVASOR DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA DEPENDIENTE DE IFNS-I DE LOS AISLADOS DE FLAVIVIRUS	59
CINÉTICA DE INFECCIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>FLAVIVIRUS</i> EN DISTINTOS MODELOS CELULARES	67
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMEN

Los *Flavivirus* son virus envueltos los cuales tienen un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Los virus del dengue (DENV) y Zika (ZIKV) son especies clasificadas en este género relacionadas filogenéticamente y con importancia clínica en todo el mundo.

A la fecha se han identificado cuatro serotipos de DENV (DENV1 – DENV4) y uno de ZIKV, cada uno se subclasifica en genotipos y, en el caso de dengue, estos a su vez en clados y subclados. El genoma de estos virus es replicado por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) cuya tasa de mutación es alta y ocasiona la generación de variantes genéticas denominadas cuasiespecies, durante cada ciclo de replicación viral. Estas cuasiespecies se encuentran bajo presión de selección durante la infección en el hospedero teniendo características genotípicas y fenotípicas que se seleccionan positivamente cuando favorecen la adaptación al hospedero, por ejemplo, la capacidad de evasión de la respuesta inmunológica innata antiviral.

Uno de los elementos de esta respuesta en el hospedero humano son los interferones de tipo I (IFNs-I) que son esenciales en la respuesta inmunológica antiviral, y por tanto anti-DENV y anti-ZIKV debido a que son producidos desde etapas tempranas de la enfermedad contribuyendo a controlar la diseminación del virus, además de contribuir a modular la respuesta inmunológica antiviral adaptativa. Ya que esta respuesta es altamente eficiente en el control de la infección, ambos virus han desarrollado múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmunológica en diferentes puntos de la cascada de señalización de los IFNs-I.

Una variable que influye en la severidad de la presentación clínica por infección por *Flavivirus* es la variabilidad de la respuesta inmunológica entre individuos, lo cual se ve reflejado en el amplio espectro de las manifestaciones clínicas que genera la infección con *Flavivirus*. Múltiples estudios han correlacionado la presencia de polimorfismos en hospederos susceptibles, con el grado de severidad de las manifestaciones clínicas durante la infección con *Flavivirus*. En

nuestro país se ha demostrado que la población mexicana es genéticamente diversa en comparación con otras poblaciones endémicas latinoamericanas, por lo que es posible que las variantes genéticas de *Flavivirus* seleccionadas en México, presenten distintos fenotipos evasores de IFNs-I. La caracterización de estas diferencias en los fenotipos de evasión, podría permitir la pronta identificación de variantes emergentes potencialmente virulentas o más transmisibles entre la población. Con la finalidad de identificar si existe diversidad en la selección de variantes de *Flavivirus* con el fenotipo evasor de IFNs-I en México, se realizó un primer acercamiento en la ciudad de Oaxaca, donde se obtuvieron cuatro aislados flavivirales a partir de muestras sanguíneas de individuos con diagnóstico serológico de DENV en etapa febril, durante el brote del año 2019. Se desarrolló un modelo para el estudio de la susceptibilidad a IFNs-I en cultivos celulares *in vitro*, donde células Vero son pre-estimuladas con IFN- α recombinante y posteriormente infectadas a través de los aislados de *Flavivirus*.

Al respecto, se identificó al aislado llamado Oax35 como el mejor evasor de la respuesta a IFNs-I a pesar de mostrar menor capacidad citopática que los demás aislados, mientras que el aislado Oax10, uno de los pobres evasores de la respuesta a IFNs-I, aumentó progresivamente su capacidad citopática a lo largo de la cinética de replicación. Al comparar su capacidad de infección de células humanas, observamos que el aislado Oax35 presentó mayor producción de partículas infecciosas durante la infección de la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos HFF-1, en contraste del aislado Oax10, lo cual correlaciona con su fenotipo evasor de la respuesta a IFNs-I. Sin embargo, en la infección de la línea celular de monocitos de humano U937, el aislado Oax10 mostró mayor producción de partículas infecciosas en contraste del aislado Oax35, lo cual sugiere la selección de diferentes variantes genéticas virales con fenotipos variables durante un mismo brote y en una misma región geográfica. Estos resultados nos permiten proponer que la sensibilidad a IFNs-I y la capacidad de replicación en distintos tipos celulares podrían contribuir a la severidad de la enfermedad, cuyo conocimiento posee potencial de uso para la vigilancia epidemiológica de *Flavivirus*.

ABSTRACT

Flaviviruses are enveloped viruses which have positive sense, single-stranded RNA genomes. Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses are phylogenetically related species classified in this genus and are of clinical importance worldwide.

To date, four serotypes of DENV (DENV1 - DENV4) and one of ZIKV have been identified, each subclassified into genotypes and, in the case of dengue, these in turn are classified goes into clades and subclades. The genomes of these viruses are replicated by the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) whose high mutation rate results in the generation of genetic variants called quasispecies during each viral replication cycle. These quasispecies are under selective pressure in favor toward the host during infection and their genotypic and phenotypic characteristics are positively selected when they favor adaptation to the host, for example, the ability to evade the antiviral innate immune response.

One of the key elements of this response in the human host are type I interferons (IFNs-I) which are essential in the antiviral immune response, and therefore anti-DENV and anti-ZIKV immune response because they are produced from early stages of the disease contributing to control the spread of the virus, as well as contributing to modulate the adaptive antiviral immune response. IFNs-I are highly efficient in controlling the infection, however, both viruses has developed multiple strategies to evade it.

A variable that influences the clinical presentation in *Flavivirus* infection is the variability of the immune response between individuals, which is reflected in the wide spectrum of clinical manifestations generated by *Flavivirus* infection. Multiple studies have correlated the presence of polymorphisms in susceptible hosts with the degree of severity of clinical manifestations during *Flavivirus* infection. In our country, it has been demonstrated that the Mexican population is genetically diverse in comparison with other endemic Latin American populations, so it is possible that the genetic variants of *Flavivirus* selected in Mexico, present different IFNs-I evasive phenotypes. The characterization of these differences in the evasion phenotypes could allow the early identification of potentially virulent or

more transmissible emerging variants in the population. In order to identify whether there is diversity in the selection of *Flavivirus* variants with the IFNs-I evasive phenotype in Mexico, a first approach was performed in the city of Oaxaca, where four flaviviral isolates were obtained from blood samples of individuals with serological diagnosis of DENV in febrile stage during the outbreak of 2019. A model was developed to study the susceptibility to IFNs-I in *in vitro* cell cultures, where Vero cells are pre-stimulated with recombinant IFN- α and subsequently infected through *Flavivirus* isolates.

In this regard, the isolate named Oax35 was identified as the best evader of the IFNs-I response despite showing lower cytopathic capacity than the other isolates, while isolate Oax10, one of the poor evaders of the IFNs-I response, progressively increased its cytopathic capacity throughout the replication kinetics. When comparing their ability to infect human cells, we observed that isolate Oax35 presented higher production of infectious particles during infection of the human dermal fibroblast cell line HFF-1, in contrast to isolate Oax10, which correlates with its IFNs-I response evader phenotype. However, in the infection of the human monocyte cell line U937, the Oax10 isolate showed higher production of infectious particles in contrast to the Oax35 isolate, suggesting the selection of different viral genetic variants with variable phenotypes during the same outbreak and in the same geographic region. These results allow us to propose that sensitivity to IFNs-I and the ability to replicate in different cell types could contribute to the severity of disease, this knowledge has the potential use for epidemiological surveillance of *Flavivirus*.

INTRODUCCIÓN

TAXONOMÍA DEL GÉNERO *FLAVIVIRUS*

La familia *Flaviviridae* incluye a más de 60 especies subclasificadas dentro de cuatro géneros diferenciados mediante la relación filogenética de secuencias de aminoácidos en dominios conservados de su RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp): *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus* (Simmonds et al., 2017). El género *Flavivirus* consiste en más de 50 especies de entre las cuales la mayoría son arbovirus (virus transmitidos por artrópodos ya sean mosquitos o garrapatas) cuyos hospederos primarios son mamíferos y aves. Entre los *Flavivirus* de importancia médica en humanos se encuentran el virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del dengue (DENV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus del Nilo Occidental (WNV) y virus del Zika (ZIKV) que desencadenan desde enfermedades asintomáticas hasta formas severas como fiebres hemorrágicas o enfermedades neurológicas. Otros miembros pueden afectar animales domésticos o silvestres, así mismo se han descrito virus que infectan sólo artrópodos o bien sólo mamíferos (Simmonds et al., 2017).

Las especies del género *Flavivirus* se clasifican con base en las diferencias genéticas entre su proteína de envoltura (E); a pesar de que esta proteína tiene una organización estructural altamente conservada, su secuencia de aminoácidos puede variar entre 45-60% entre las especies de *Flavivirus* (Heinz & Stiasny, 2017). En este sentido ZIKV está más cercanamente relacionado con DENV (mostrando homología del 54-57% en aminoácidos) que con JEV y YFV (Heinz & Stiasny, 2017; Rockstroh et al., 2017)

El DENV se subclasifica en cuatro serotipos genética y serológicamente diferentes debido a la variabilidad en su proteína E, donde se encuentran los epítomos inmunodominantes para los que se generan anticuerpos neutralizantes durante la infección. La capacidad de neutralización cruzada es la base de la clasificación del sero-complejo de DENV en: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Adicionalmente, dentro de cada serotipo se han identificado variantes con una divergencia de secuencia no superior al 6% entre las secuencias de E/NS1, lo que

ha llevado a la subclasificación en genotipos (Weaver & Vasilakis, 2009). El DENV-1 se subclasifica en los genotipos I, II, III, IV, y V; el DENV-2 se subclasifica en los genotipos Americano, Asiático I, Asiático II, Americano-Asiático, Cosmopolita y Selvático; el DENV-3 se subclasifica en los genotipos I, II, III, V y IV, aunque este último es poco común entre poblaciones humanas; y el DENV-4 se subclasifica en los genotipos I, II (dividido en IIa y IIb), III, IV (o selvático) y V (Quintero Gil et al., 2010; Weaver & Vasilakis, 2009).

Estos genotipos se distribuyen de manera variable en diversas regiones geográficas gracias a su capacidad de adaptación al vector y al hospedero humano (Cuypers et al., 2018), incluso se ha descrito el desplazamiento epidemiológico intra-serotipo entre ellas; que ha demostrado correlación con importantes brotes epidemiológicos. Por ejemplo, el genotipo Asiático de DENV-2 se encuentra más ampliamente distribuido en el mundo y se ha postulado que tiende a desplazar al genotipo Americano del mismo serotipo, lo cual sugiere distinto potencial de infección y epidémico de las variantes predominantes de dichos brotes (Quintero Gil et al., 2010) A su vez, la diversidad genética dentro de cada genotipo se define como clados, por ejemplo en el genotipo Asiático-Americano de DENV-2 se han identificado el clado I, II y III; y estos a su vez están divididos en subclados como el IA y IB (McElroy et al., 2011).

Del ZIKV únicamente se ha descrito un serotipo, el cual se subclasifica en tres principales linajes genéticos o genotipos: el Africano oriental, Africano occidental y Asiático que presentan aproximadamente un 6% de divergencia en su secuencia de la proteína E (Heinz & Stiasny, 2017). Desde su introducción al continente americano en 2015, los casos de infección por ZIKV han ido en descenso anualmente, lo cual no ha facilitado el estudio del potencial desplazamiento epidemiológico entre los genotipos de ZIKV, sin embargo, recientemente se identificó la circulación del genotipo Africano en el continente americano, donde únicamente se había identificado el genotipo Asiático. Este aislamiento ocurrió a partir de mosquitos y primates no humanos, sin embargo, se desconoce el fenotipo asociado a la capacidad de adaptación asociada al desplazamiento.

Existe evidencia de variantes de ZIKV con características genéticas en proteínas no estructurales que podrían favorecer su capacidad replicativa y prevalencia en el mosquito y en el hospedero mamífero, por ejemplo, una mutación en la proteína no estructural 1 (NS1) fijada en el genotipo Asiático de ZIKV favorece su unión a la proteína celular TBK1, ocasionando la reducción de la fosforilación de TBK1 y la inhibición de la expresión del gen de *ifn β* (WHO, 2022; Kasprzykowski et al., 2020).

CURSO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD Y PATOGÉNESIS DEL DENGUE Y ZIKA

El DENV y ZIKV son transmitidos por los mosquitos hembra hematófagos de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, principalmente. Estos mosquitos adquieren el virus al alimentarse de la sangre de un mamífero primate o humano infectado y en estado de viremia, aunque también se ha reportado la transmisión vertical del virus hacia las larvas ovipositadas por mosquitos adultos infectados, contribuyendo al mantenimiento de la circulación de estos virus en la naturaleza (Ferreira-De-Lima & Lima-Camara, 2018).

Enfermedad del dengue

La infección con cualquiera de los cuatro serotipos del DENV puede ocasionar la enfermedad del dengue la cual, en la mayoría de los casos, se presenta de manera asintomática o con síntomas leves, pero en 1-5% de casos se desarrollan formas más severas. A partir del 2009, la Organización Mundial de la Salud definió el diagnóstico clínico de la enfermedad del dengue en tres posibles clasificaciones según su gravedad: dengue sin signos de alarma (DSSA), dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG). Esta clasificación se realiza entre el final de la etapa febril y durante la etapa crítica. Si el paciente se recupera después de la disminución de la temperatura al final de la etapa febril y únicamente cursó signos y síntomas como fiebre, náuseas o vómito, erupciones cutáneas, malestar y dolor general, prueba de torniquete positiva y/o leucopenia, se clasifica como DSSA. Si

se agrava y presenta estos signos y al menos uno de los signos de alarma: dolor abdominal intenso, vómito persistente, sangrado en mucosas, letargia, aumento del hematocrito, hepatomegalia y/o trombocitopenia, se clasificará como DCSA. De no atenderse adecuadamente estos signos puede evolucionar a la forma más grave de la enfermedad: el DG que se caracteriza por la extravasación del plasma que conduce al estado de choque e incluso a insuficiencia respiratoria, hemorragias graves y compromiso orgánico (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009).

El curso clínico de la enfermedad en el humano se divide en tres fases: febril, crítica y de convalecencia. La infección inicia con la inoculación de partículas virales infecciosas de un mosquito portador del virus durante su alimentación a un hospedero susceptible, a partir de la inoculación, el periodo de incubación es entre 3 y 7 días. A partir de la aparición del primer síntoma comienza la etapa febril con duración de 3-7 días, ésta se caracteriza por el aumento de la temperatura de forma abrupta a más de 39°C acompañada de los signos y síntomas leves característicos del DSSA. En la fase febril es complicado diferenciar la enfermedad del dengue de otras enfermedades febriles, sin embargo, una prueba de torniquete positiva indicadora de fragilidad capilar, y la reducción progresiva de leucocitos en sangre (leucopenia) son indicadores de alta probabilidad de dengue (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009).

Cuando la fiebre disminuye a 38°C o menos es indicador de la evolución hacia la etapa crítica donde, en caso de presentarse DCSA o DG, aumenta la permeabilidad capilar y el hematocrito, y disminuye el número de plaquetas en sangre (trombocitopenia). El aumento o disminución de la permeabilidad capilar es crucial para determinar la progresión del paciente; si disminuye, el paciente resuelve la enfermedad más rápidamente y se clasificará como DSSA, pero si aumenta empeorará a formas más severas, por ejemplo, la extravasación de plasma como consecuencia del aumento de la permeabilidad capilar y vascular. Esta pérdida de volumen plasmático, en conjunto con la disminución de la temperatura, orillan a un estado de choque el cual, si es prolongado, ocasiona el

deterioro de órganos como hígado, corazón y sistema nervioso central, acidosis metabólica y coagulación intravascular. Esto, a su vez, lleva a hemorragias severas que, en conjunto con la falla multiorgánica, puede llevar a la muerte (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009). La etapa crítica puede durar de 1 hasta 4 días, si se supera, se entra a la etapa de convalecencia donde gradualmente hay reabsorción de líquidos del compartimiento extravascular permitiendo la mejora y el bienestar general del paciente. El hematocrito se vuelve estable o incluso puede ser menor, debido a la reabsorción de líquidos; se recupera el número basal de leucocitos y de plaquetas (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009).

Enfermedad del Zika

La infección por ZIKV a partir de la inoculación de las partículas virales por el mosquito tiene un periodo de incubación de 3 hasta 14 días. Ocasiona un amplio espectro de manifestaciones clínicas como fiebre, eritema, conjuntivitis no purulenta, mialgia, artralgia y cefaleas con una duración de 2 a 7 días, aunque la mayoría de los casos son asintomáticos o no son de gravedad. Las formas graves de la infección por ZIKV incluyen el síndrome de Guillain-Barré (GBS) y el síndrome congénito asociado a Zika.

El GBS es una neuropatía autoinmune caracterizada por daño neuronal, el cual puede manifestarse clínicamente como parálisis muscular y síntomas como dolor, entumecimiento u hormigueo. El GBS después de la infección por el virus del Zika presenta una progresión rápida a partir de 6 días iniciada la infección, desarrollando una neuropatía axonal motora aguda que, en el peor pronóstico, puede derivar en cuadriplejía o necesidad de soporte de ventilador. La patogénesis exacta del GBS posterior a la infección por ZIKV no está completamente descrita, pero se han identificado autoanticuerpos IgG e IgM anti-gangliósidos en pacientes con Zika que desarrollaron GBS (Zhu et al., 2021). Es probable que durante la infección con ZIKV se haya dado la presentación antigénica de los gangliósidos de neuronas infectadas junto con los antígenos

virales, resultando en la producción de anticuerpos contra ambos. La reactividad cruzada de estos anticuerpos podría ser causante de la patogénesis del GBS (Rivera-Correa et al., 2019). Otros estudios han sugerido que el ZIKV puede infectar directamente las células de Schwann, aumentando la expresión de mRNAs de IL-6, IFN- β 1, IFN- λ , IFIT-1, TNF- α e IL-23 (Alboudi & Jameson, 2021; Dhiman et al., 2019).

Los brotes de Zika en América Central y Sudamérica durante 2015-2016 fueron acompañados por el aumento en la incidencia de microcefalia congénita, llevando a la investigación de la transmisión vertical del ZIKV en el humano mediante el análisis de los datos epidemiológicos y desarrollando modelos animales (Oeser & Ladhani, 2019). Cuando una mujer embarazada es inoculada con partículas virales infecciosas de ZIKV durante el primer y segundo trimestre del embarazo, el virus puede transmitirse de la madre al feto (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2021). El neurotropismo de este virus favorece la infección de células precursoras neuronales humanas, mientras que en un modelo murino se describió su capacidad de infectar el cerebro embrionario desencadenando el arresto del ciclo celular, la apoptosis y la inhibición de la diferenciación de células progenitoras neuronales afectando el desarrollo de este tejido (C. Li et al., 2016). Por esta razón, se ha propuesto que clásicamente ocasiona la microcefalia, pero también se han descrito otras malformaciones congénitas asociadas a la infección como contracturas de los miembros, hipertonía muscular, alteraciones oculares y sordera; a este conjunto de malformaciones se le conoce como síndrome congénito asociado a Zika (Oeser & Ladhani, 2019).

Diagnóstico de la enfermedad del dengue y Zika

En la fase febril del dengue, el diagnóstico clínico puede confirmarse mediante la detección del RNA viral empleando ensayos de RT-qPCR ya que, en los primeros 5-6 días de la infección, se presenta la máxima viremia, lo que permite la identificación del serotipo. En este mismo periodo las células infectadas secretan la proteína viral no estructural 1 (NS1) a circulación sanguínea en forma de dímero

y hexámero, por lo que, puede ser detectada mediante una prueba serológica de antígeno. Si el diagnóstico en laboratorio se realiza durante la etapa crítica se recomienda realizar serología con base en la detección de isotipos IgM e IgG anti-DENV utilizando ensayos de ELISA o pruebas rápidas de inmunocromatografía para el diagnóstico confirmatorio (Guzman et al., 2016).

En el caso de la enfermedad del Zika, durante el periodo en que se presentan los síntomas, los títulos de viremia alcanzan su máximo, por lo que se recomienda su diagnóstico mediante ensayos de RT-qPCR. Si la toma de muestra es posterior a los 7 días de iniciados los síntomas, es recomendable el diagnóstico mediante la detección de anticuerpos IgM utilizando ensayos de ELISA (OMS, 2016).

El resultado positivo de una prueba de IgM y una prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT) es útil para el diagnóstico diferencial entre DENV y ZIKV; en esta prueba se añaden partículas infecciosas de ZIKV o DENV a una muestra de suero del paciente infectado. Los anticuerpos especie-específicos de la muestra neutralizarán el virus causante de la infección reduciendo su capacidad de infectar un cultivo de células *in vitro*, y su posterior formación de placas líticas (Beltrán-Silva et al., 2018).

PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE DENGUE Y ZIKA EN MÉXICO

Panorama epidemiológico de DENV

Actualmente, la enfermedad del dengue es endémica en más de 100 países del continente Americano, África, el Mediterráneo oriental, Asia sudoriental y el Pacífico occidental. Se encuentra ampliamente distribuido en países localizados en regiones tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo debido a la distribución geográfica de su mosquito vector. Recientemente, las especies de mosquitos *Ae. albopictus* han mostrado mayor capacidad de adaptación a nuevas regiones geográficas contribuyendo a ampliar el rango geográfico del virus y el riesgo de incidencia de la enfermedad a estas zonas (Messina et al., 2019).

DENV-1 emergió por primera vez en el continente Americano en 1977, posteriormente emergió DENV-2 y DENV-4 durante 1982, y finalmente en 1993 emergió DENV-3. La co-circulación de los cuatro serotipos en América dio origen a su hiperendemicidad en esta región junto con los primeros reportes de dengue severo en varios países de América entre 1981 y 1997 (Gubler, 1998). En México, surgieron epidemias importantes de DENV-1 en varios estados del país entre 1979 y 1983. El DENV-2 se identificó por primera vez en 1982 seguido del DENV-4; finalmente durante 1984 se identificó la circulación de DENV-3. El primer caso confirmado de dengue severo en México se reportó en 1985 y se estableció la endemicidad del dengue entre 1995 y 1996 (Hernández-García et al., 2020).

Actualmente los cuatro serotipos del DENV circulan en la república mexicana; en algunos estados hay evidencia de circulación simultánea de dos o más, siendo más abundantes los serotipos 1 y 2, y en menor proporción los serotipos 3 y 4 (Fajardo-Dolci et al., 2012). La co-circulación de los cuatro serotipos ocurre de manera cíclica, lo cual está relacionado con la permanencia de la epidemia del dengue en ciclos de intensidad variable entre años epidémicos. Este fenómeno ocurre como consecuencia de la co-circulación de serotipos variable, el desplazamiento epidemiológico entre variantes genéticas de los serotipos y de las características del hospedero, el vector y el virus que favorecen o no la transmisión (Fajardo-Dolci et al., 2012; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009). La distribución tan variable de los serotipos de DENV en México corrobora la naturaleza compleja y dinámica de la circulación del virus a través del país (Hernández-García et al., 2020).

La circulación del DENV en México está reflejada en la prevalencia de la enfermedad del dengue, considerada un problema de salud pública persistente en México, la cual genera brotes anuales con fluctuaciones en el número total de casos confirmados y de casos severos. Actualmente, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reporta que a la semana epidemiológica 52 del 2021, se registraron 6,746 casos totales confirmados, de los cuales 4,453 (66%) correspondieron a dengue no grave (DNG) y 2,293 (34%) a dengue con

signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG); el 70% de estos casos correspondieron a los estados de Sinaloa, Coahuila, Veracruz, Morelos y Oaxaca, donde se reportan las tasas de incidencia más altas (Dirección de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmisibles, 2021b).

Para este trabajo se recolectaron muestras del estado de Oaxaca durante el año 2019 en el que el SINAVE reportó que en México se registraron 41,505 casos totales confirmados de dengue, de los cuales 27,884 (67.18%) correspondieron a DNG y 13,621 (32.81%) a DCSA y DG. El 69% de los casos correspondieron a los estados de Jalisco, Veracruz, Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca. Particularmente, en este año se reportó el mayor aumento del número de casos de los últimos 5 años.

El estado de Oaxaca se ha caracterizado por la co-circulación de múltiples serotipos de DENV, en 2019 se registraron 1,678 casos confirmados de dengue de los cuales 1,054 (62.8%) fueron DNG siendo mayor que a los años 2018 y 2020, mientras que los 513 (30.5%) de DCSA y 111 (6.6%) de DG disminuyeron respecto a los mismos años. Durante 2019 la tasa de incidencia fue de 40.86 y de letalidad de 0.96. De los casos reportados, 895 fueron serotipificados como DENV-1, 488 como DENV-2 y 3 como DENV-3, sin registro de DENV-4 (Dirección General de Epidemiología (DGE), 2019).

Panorama epidemiológico de ZIKV

El ZIKV fue aislado inicialmente en África, sin embargo, en 2007 surgió un brote al sur del Océano Pacífico que dio paso a su propagación al continente Americano. En 2015 en Brasil se originó la primera epidemia que se extendió en América Central, América del Sur y el Caribe (Song et al., 2017). En este mismo año se identificó por primera vez en México, pero el registro máximo de casos confirmados ocurrió durante la epidemia de 2016 con 7,560 casos; a partir de entonces el número de casos ha disminuido progresivamente cada año hasta registrar apenas 35 casos en 2021 (Dirección de vigilancia epidemiológica de

enfermedades transmisibles, 2021a). De tal forma que a la semana epidemiológica 52 de 2021 el número de casos confirmados acumulados ha sido de 12,991, de los cuales 138 se reportaron durante 2019 y 9 corresponden al estado de Oaxaca.

Con respecto a las formas severas de la presentación clínica por la infección con el ZIKV, en México, de 2016 a 2021 se han reportado 56 casos de síndrome congénito asociado a Zika, mientras que la última actualización de casos de síndrome Guillain-Barré asociado a Zika reporta 19 casos confirmados hasta 2018 (Secretaría de Salud, 2018, 2021).

ESTRUCTURA DE LA PARTÍCULA FLAVIVIRAL

Las partículas maduras de *Flavivirus* son de aproximadamente 50 nm de diámetro con genomas de RNA de 9-13 kb; la envoltura viral está constituida por una bicapa lipídica derivada del hospedero sobre la cual se organizan las proteínas virales de la envoltura (E) y de membrana (M). Esta envoltura a su vez rodea a la nucleocápside (NC) conformada por la proteína de cápside (C) y el genoma flaviviral cuya naturaleza es de RNA monocatenario de polaridad positiva (ssRNA+).

Características y funciones de las proteínas virales

Proteína de envoltura (E)

La proteína E tiene un peso de 53 kDa con aproximadamente 500 aminoácidos; la partícula viral contiene 180 copias de esta proteína organizadas en 90 homodímeros antiparalelos que se acomodan en grupos de tres formando 30 “balsas” que cubren la superficie de la bicapa lipídica (Nicholls et al., 2020). Las principales funciones de esta proteína son la unión al receptor celular y la fusión viral con la membrana endosomal (Dey et al., 2021).

Esta proteína se ancla a la envoltura viral a través de dos dominios transmembranales localizados en su extremo C-terminal, mientras su ectodominio

está conformado por tres dominios: DI, DII y DIII. DI es el dominio estructural central, mientras DII media la dimerización del ectodominio de E y contiene en su extremo distal el péptido fusogénico involucrado en la fusión de la membrana viral con la membrana celular durante la entrada viral. DIII está más expuesto sobre la superficie viral y contiene motivos y epítomos para la unión a receptores celulares como DC-SIGN, receptores de manosa, proteínas de choque térmico, entre otros; aunque no se han logrado identificar de manera específica. La proteína E, además, contiene glicosilaciones involucradas en su interacción con factores de adhesión a la membrana celular, por ejemplo, el heparán sulfato y las lectinas (Cruz-Oliveira et al., 2015).

Proteína de membrana (prM/M)

La glicoproteína prM pesa aproximadamente 21 kDa y está conformada de siete cadenas β -plegadas de unión a membrana conectadas a un dominio transmembranal C-terminal con dos α -hélices. Es traducida como una proteína precursora conformada por un dominio M de 76 residuos y un péptido *pr* de 91 residuos. El precursor se ensambla en las partículas virales inmaduras en el retículo endoplasmático (RE) donde el péptido *pr* protege el péptido fusogénico de E, previniendo la fusión de membranas celulares y virales antes de la liberación al medio extracelular (Nicholls et al., 2020). Al llegar a la red *trans* del complejo de Golgi (TGN), el precursor prM es procesado proteolíticamente por la proteasa furina celular separando el péptido *pr* de la proteína M, seguido de un cambio conformacional de E dependiente de pH; de esta forma se lleva a cabo la maduración de las partículas virales (Cruz-Oliveira et al., 2015).

La proteína M presente en la envoltura de las partículas virales maduras pesa 8 kDa y se localiza por debajo de la proteína E; ambas presentan interacciones hidrofóbicas que estabilizan su interface dimérica, dándole estabilidad a la partícula completa (Nicholls et al., 2020). Además, contiene residuos de histidina en su extremo N-terminal que, durante la entrada viral, al ser protonados por la disminución del pH en endosomas tardíos, promueven su disociación de la

proteína E permitiendo la exposición del péptido fusogénico hacia la membrana endosomal liberando la NC hacia el citoplasma celular (Cruz-Oliveira et al., 2015).

Proteína de cápside (C)

La proteína C está constituida por una gran cantidad de aminoácidos con carga positiva dándole un perfil básico. Tiene un tamaño de 100-120 aminoácidos generando una proteína con un peso molecular de 11 y 12 kDa. Está conformada por 4 α -hélices y se ensambla en dímeros unidos a través de interacciones hidrofóbicas; estos dímeros tienen una carga distribuida asimétricamente que permite la interacción con el RNA viral en la región N-terminal donde contiene residuos de carga positiva, mientras que en su lado opuesto interactúa con proteínas E y M a través de un extremo no polar hidrofóbico (García-Blanco et al., 2016). Aunque tiene un papel central en el empaquetamiento del genoma viral formando la NC, también interactúa con diversas proteínas celulares regulando sus funciones como la inducción de apoptosis y autofagia, así como irrumpir la formación de nucleosomas con lo que puede favorecer el ciclo replicativo y la proliferación viral (Dey et al., 2021).

Proteína no estructural 1 (NS1)

Es una glicoproteína de 48 kDa indispensable en diferentes etapas del ciclo de replicación viral y en la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero. Durante la infección con DENV es secretada por la célula infectada en múltiples formas oligoméricas. Inicialmente es producida como monómero, pero tras ser glicosilada cambia a una forma dimérica. Los dímeros de la proteína NS1 participan en la replicación viral junto con las proteínas virales NS4A y NS4B, pues co-localizan en los complejos de replicación (RC) formados en el RE (Glasner et al., 2018). Adicionalmente, se ha demostrado que la NS1 de ZIKV y DENV participan en el ensamblaje y liberación de partículas virales dirigiendo los nuevos genomas sintetizados hacia el sitio de ensamblaje (Mazeaud et al., 2018). Al

oligomerizarse en su forma hexamérica es secretada hacia el espacio extracelular donde modula la respuesta inmunológica del hospedero y contribuye al incremento de la permeabilidad vascular (Dey et al., 2021; Libraty et al., 2002).

Proteína no estructural 2 (NS2)

La región NS2 del genoma viral codifica para dos proteínas; NS2A y NS2B. NS2A es una proteína pequeña transmembranal de 22 kDa que funge como un eje central para el ensamblaje ya que recluta tanto al RNA viral, como a los complejos multiprotéicos C-prM-E y NS2B-NS3 a los sitios de ensamblaje (Xie et al., 2019). Incluso se ha especulado su posible participación como viroporina, pues contribuye a remodelar membranas celulares para la formación de los sitios de ensamblaje a donde dirige los RNAs sintetizados a través de sus interacciones con el 3'UTR (Shrivastava et al., 2017). También interactúa con NS3 y NS5 contribuyendo a la replicación, y regula el procesamiento proteolítico de C-prM (Barnard et al., 2021).

Por otro lado, NS2B es una proteína pequeña transmembranal de 14 kDa. Es un cofactor esencial para el correcto plegamiento y función serin-proteasa de la NS3 en el reconocimiento y proteólisis de la poliproteína flaviviral, además contribuye al anclaje de NS3 al sitio de replicación permitiendo la formación del complejo de replicación viral (Xing et al., 2020). Adicional a su función como cofactor, se ha sugerido como evasor de la respuesta inmunológica innata, al impedir la detección mitocondrial de DNA resultado del daño celular ocasionado durante la infección, derivando en la inhibición de la producción de IFN tipo I (Aguirre et al., 2017). Se ha documentado que el complejo de multiprotéico NS2B-NS3 junto con NS2A está involucrado en el ensamblaje a través del procesamiento de la poliproteína, coordinación de factores celulares y virales y el reclutamiento del RNA viral (X.-D. Li et al., 2016).

Proteína no estructural 3 (NS3)

NS3 es una proteína de 70 kDa cuya secuencia es altamente conservada entre *Flavivirus* y tiene un papel multifuncional durante la replicación viral. Está dividida en dos dominios funcionales: el dominio N-terminal tiene actividad proteasa de serina, que en conjunto con su cofactor NS2B, es esencial para el procesamiento de la poliproteína viral entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K, NS4B/NS5, y C/prM (Barrows et al., 2018). El dominio C-terminal tiene actividad trifosfatasa y helicasa que contribuyen en desenrollar el RNA durante la replicación y en las primeras etapas del *capping* de los RNAs nacientes (Luo et al., 2008; Wang et al., 2018). De igual manera se ha descrito que contribuye a la remodelación de membranas celulares durante la replicación y al empaquetamiento de los nuevos genomas (Dey et al., 2021; Heaton et al., 2010).

Proteína no estructural 4 (NS4)

La proteína NS4 está compuesta por dos proteínas: NS4A y NS4B. NS4A es una proteína integral de membrana de 16 kDa que conforma el complejo de replicación flaviviral junto con las proteínas NS2A, NS2B y NS4B (Zou et al., 2015). Es la principal responsable de la remodelación de la membrana del RE para la formación de los RC virales mediante su oligomerización e interacción con NS4B y membranas lipídicas (Hung et al., 2015). También se ha propuesto su papel regulador de la actividad ATPasa de la NS3. En su extremo C-terminal contiene una región hidrofóbica (denominada péptido 2K en algunos *Flavivirus*) que funge como una secuencia señal para la traslocación de NS4B al lumen del RE (S. Miller et al., 2007).

Por otro lado, NS4B pesa 27 kDa y es considerada un importante componente del complejo de replicación ya que interacciona con proteínas virales NS1 y otras proteínas del hospedero (X. D. Li et al., 2015). Además, interactúa con la helicasa NS3 mejorando su procesividad y promoviendo la disociación del ssRNA, por lo que indirectamente estimula su reclutamiento hacia intermediarios replicativos de

dsRNA para separar ambas cadenas (Umareddy et al., 2006). También inhibe translocación nuclear de STAT1, restringiendo la señalización efectora de los IFNs-I (Munoz-Jordan et al., 2003). En infecciones por ZIKV, NS4A y NS4B suprimen la vía AKT-mTOR perturbando la autofagia y estabilidad celular (Liang et al., 2016), mientras que al interactuar con la proteína Dicer inhibe la generación de RNAs pequeños de interferencia (siRNA) por lo que inhiben el silenciamiento de mRNA. (Kakumani et al., 2013).

Proteína no estructural 5 (NS5)

La proteína NS5 es la de mayor tamaño (103 kDa) y la más conservada entre *Flavivirus*. Sus extremos N- y C-terminales contienen dominios para actividades enzimáticas indispensables para la traducción y replicación flaviviral, respectivamente. El dominio metiltransferasa (MTasa) contribuye a la formación del *cap* tipo I en el extremo 5' (Zhao et al., 2015), mientras que la actividad RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) lleva a cabo la replicación que inicia de *novo* (no depende de un *primer*), la cual requiere de un *priming loop* que facilita los primeros pasos de la síntesis de RNA y estabiliza el extremo 3' del molde de RNA junto con los NTPs para la elongación de la cadena naciente (Lu & Gong, 2017; Yap et al., 2007). La proteína NS5 también contribuye de manera significativa a la patogénesis viral ya que contrarresta el sistema inmunológico bloqueando la vía de señalización JAK-STAT estimulada por IFNs-I (Lin et al., 2006).

Características estructurales del genoma flaviviral

El genoma flaviviral (gRNA) es de aproximadamente 11kb, contiene un *cap* tipo I en su extremo 5' seguido de una región no traducida (5' UTR). A continuación, comienza su único marco de lectura abierto (ORF) que codifica para las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y las 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Después del ORF se encuentra otra región no traducida (3' UTR) (Figura 1). Estos genomas carecen de un tracto terminal poli(A)

en el extremo final 3', pero terminan en un dinucleótido conservado CU (Simmonds et al., 2017).

Cap en el extremo 5'

En el extremo 5' del genoma flaviviral se encuentra un *cap* tipo I ($m^7GpppAmp$), un aspecto característico del género *Flavivirus* (Figura 1A) (Simmonds et al., 2017). Su síntesis es llevada a cabo por el dominio metiltransferasa de la proteína no estructural 5 viral (NS5) (Zhao et al., 2015). Este *cap* 5' permite que el genoma flaviviral se asemeje a los RNAs celulares evitando su degradación por exonucleasas 5'-3' e impidiendo su reconocimiento por el sistema inmunológico del hospedero (Daffis et al., 2010; Göertz et al., 2018).

La metilación del *cap* 5' y la metilación en la posición 2'-O de adeninas internas del genoma flaviviral están acopladas a la replicación viral debido a que ambos eventos son llevados a cabo por distintos dominios de la NS5, este es un elemento regulador de la replicación viral (Lu & Gong, 2017).

Regiones no traducidas (5' y 3' UTR)

El marco de lectura flaviviral está flanqueado por secuencias de nucleótidos que no se traducen durante el ciclo replicativo del virus, se denominan UTR (*untranslated regions*) y se ubican en los extremos 5' y 3' del genoma (Figura 1A) (Pijlman et al., 2008). El 5'UTR tiene una longitud de cerca de 100 nucleótidos, mientras que el 3'UTR puede variar de 400 a 700 nucleótidos, dependiendo la especie de *Flavivirus*. Elementos dentro de estas regiones son esenciales para la replicación, traducción flaviviral y su patogénesis en el hospedero (Ng et al., 2017).

El 5'UTR contiene dos regiones *stem-loop* (SL) conservadas en estructura, pero variables en secuencia entre *Flavivirus*: SLA y SLB. SLA está conformado por 70 nucleótidos y es seguido de una secuencia poli(U) que permite el correcto funcionamiento de ambos SL. Adicionalmente, el 5'SLA es el promotor de la

síntesis de RNA interactuando y activando a la proteína viral NS5 en el extremo 3' del genoma circularizado, así como para la metilación del *cap* 5' (Filomatori et al., 2006; Lodeiro et al., 2009). Por otro lado, el 5'SLB tiene una longitud de 30 nucleótidos y se ubica cercano al codón de inicio del ORF; contiene la secuencia 5'UAR que participa en interacciones RNA-RNA durante la replicación viral (Figura 1B) (Alvarez et al., 2005).

Por otro lado, el 3'UTR es una región altamente estructurada en todos los *Flavivirus*. Cuenta con estructuras secundarias tipo SL y *dumbell* (DB) dentro de las cuales se encuentran secuencias conservadas (CS) y secuencias conservadas repetidas (RCS). El 3'UTR se organiza en dominios con diferente grado de conservación en secuencia genética (Mazeaud et al., 2018). El dominio I, ubicado río abajo del ORF, es altamente variable y contiene los SL, que en el DENV y ZIKV se denominan SLI y SLII. El dominio II es moderadamente conservado y comprende los DB; en DENV se han descrito dos: DB1 y DB2 que contienen el RCS2 y CS2, respectivamente; mientras que en ZIKV solamente DB1 y un pseudo-*dumbell* (Ψ -DB). El dominio III es el más conservado entre *Flavivirus* y contiene una CS1 que participa en las interacciones de largo alcance con el extremo 5', un *hairpin* pequeño (sHP) y un 3'SL, la función de este último es esencial para la replicación y traducción viral (Ng et al., 2017; Selisko et al., 2012) (Figura 1C). Entre estas estructuras se encuentran secuencias espaciadoras que permiten la correcta formación de las estructuras secundarias y su plegamiento en estructuras terciarias, como los *pseudoknots* (PK) formados a partir de la complementariedad de secuencias dentro de los SL y DB con secuencias en las regiones espaciadoras contiguas (Akiyama et al., 2016; Gebhard et al., 2011).

El 3'SL y 5'SLA son absolutamente esenciales para la replicación, se ha demostrado que su eliminación impide por completo la producción de partículas virales (Yu & Markoff, 2005). Los DB y PK del 3'UTR son importantes durante la replicación y traducción viral, sin embargo, su función se encuentra directamente relacionada con la formación de RNAs subgenómicos (sfRNA) con una función

importante en la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero mediante diferentes vías (Akiyama et al., 2016; Slonchak & Khromykh, 2018).

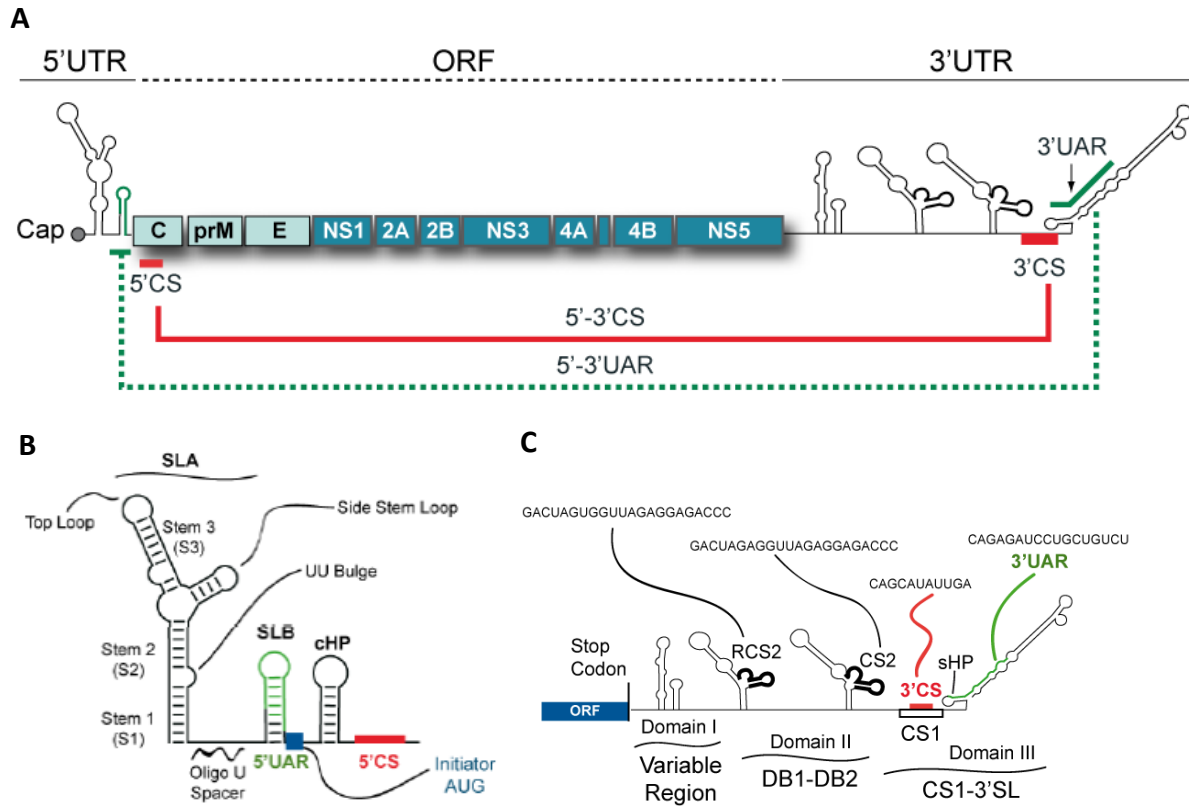


Figura 1. Organización general del genoma (gRNA) de DENV (A) y las estructuras particulares en los 5'UTR (B) y 3'UTR (C). El genoma flaviviral (A) está conformado por un cap tipo I en su extremo 5', seguido de regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3' las cuales contienen las secuencias complementarias CS y UAR permitiendo la circularización del genoma durante la replicación viral (líneas rojo y verde). Su marco de lectura abierto (ORF) codifica para las 3 proteínas virales estructurales (C, prM y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). El 5'UTR (B) contiene estructuras secundarias tipo *stem loop* (SLA y SLB) separadas por una secuencia poli(U). El SLB contiene la secuencia 5'UAR (verde) seguida del codón AUG de inicio para la traducción (azul), a continuación, se encuentra un *hairpin* (HP) y la secuencia 5'CS (rojo). El 3'UTR está organizado en tres dominios: el dominio I contiene los SLI y SLII, el dominio II contiene una o dos estructuras tipo *dumbbell* (DB1 y/o DB2), y el dominio III contiene la secuencia 3'CS (rojo) seguida de un HP corto (sHP) y el 3'SL que contiene la secuencia 3'UAR (verde). Recuperado de Gebhard, et al., 2011.

CICLO DE REPLICACIÓN FLAVIVIRAL

Reconocimiento y entrada celular

A la fecha no se ha identificado un receptor único y específico para DENV, sin embargo, se han descrito diversos candidatos de distinta naturaleza en células de mamífero y de mosquito (Cruz-Oliveira et al., 2015).

Los factores de adhesión celulares son responsables de la primera interacción de baja afinidad entre el virus y la célula, concentrando partículas virales en la superficie celular y facilitando el reconocimiento del receptor de alta afinidad (Figura 2). Los principales candidatos como factores de adhesión de DENV son los glucosaminglicanos (GAGs) a través de su interacción con el DIII de la proteína E, algunos ejemplos son el heparán sulfato y las lectinas. En células de mosquito AP-61 el glicosfingolípido L-3 se ha identificado como ligando de DENV-2. (Cruz-Oliveira et al., 2015; Nicholls et al., 2020).

Con respecto a los receptores de alta afinidad, el primero en ser descrito para DENV fue la molécula no integrina de adhesión intercelular específica de células dendríticas (DC) (DC-SIGN) expresada principalmente en células dendríticas, así como su homólogo L-SIGN expresado en células endoteliales de hígado y ganglios linfáticos. La unión a DC-SIGN ocurre mediante la interacción de su dominio de reconocimiento de carbohidratos (CDR) y los N-glicanos ricos en manosa de la proteína E. Posteriormente se describió como receptor en monocitos y macrófagos al complejo CD14-HSP90/HSP70 (proteínas de choque térmico), así como de receptores de manosa. En hepatocitos se describió a GRP78 (una chaperona que puede localizarse en la superficie celular) como receptor para DENV-2 (Upanan et al., 2008), interesantemente en estas mismas células, DENV-1 utiliza como receptor de alta afinidad a laminina, no así los demás serotipos, sugiriendo que los cuatro serotipos de DENV podrían utilizar diferentes receptores para infectar un mismo tipo celular (Thepparit & Smith, 2004). En células primarias humanas se describió que algunos receptores de fosfatidilserina de las familias TIM y TAM fungen como receptores para DENV y ZIKV mediante una interacción

dependiente de fosfatidilserina presente en la envoltura viral (Meertens et al., 2012).

En el mosquito, el receptor mejor descrito para DENV es la prohibitina, una proteína de 35 kDa (Kuadkitkan et al., 2010). No obstante, se han identificado diversas proteínas con afinidad a la partícula de DENV, entre ellas las glicoproteínas gp40 y gp45 presentes en tejidos del mosquito permisivos al virus como intestino medio, ovarios y glándulas salivales (Mendoza et al., 2002).

Después del reconocimiento del receptor, la partícula viral es internalizada a través de endocitosis, que en la mayoría de las líneas celulares estudiadas (C6/36, HeLa, A549, Huh7, HepG2, y BS-C-1) es mediada por clatrina (Schaar et al., 2007). Sin embargo, en otras, como la línea celular Vero, ocurre mediante una vía no clásica independiente de clatrina, usualmente dependiente de dinamina (Acosta et al., 2009). Se ha descrito que la vía de entrada puede depender de la célula hospedera e incluso del serotipo y la variante de DENV, en algunas ocasiones recurriendo a la macropinocitosis. Dentro de la célula, la partícula viral es colocada en un endosoma temprano con pH básico de aproximadamente 6.5 (Figura 2) (Lescar et al., 2001).

Desencapsidación

En la membrana de los endosomas tempranos se encuentran los complejos de ATPasas vacuolares que bombean protones al interior del endosoma ocasionando su acidificación (Barrows et al., 2018). La disminución del pH induce una serie de cambios conformacionales en la proteína E que culminan en la fusión de la membrana viral y endosomal (Lescar et al., 2001). Cuando el ambiente es de pH ácido, las histidinas de la proteína E se protonan y cargan positivamente, ocasionando el alejamiento de los residuos básicos e induciendo la reorganización de la proteína E en trímeros que exponen el péptido fusogénico del DII para su inserción en la membrana exterior de la membrana endosomal (Modis et al., 2004; Stiasny & Heinz, 2004; Zheng et al., 2010). La fusión de ambas membranas

ocasiona la formación de un poro a través del cual se libera la NC hacia el citoplasma donde la cápside puede sufrir ubiquitinización que desestabiliza los complejos de cápside liberando el genoma viral (Figura 2) (Byk et al., 2016).

Traducción de la poliproteína viral

Una vez en el citoplasma celular, el genoma viral es traducido directamente por los ribosomas celulares (Figura 2). Este primer ciclo de traducción viral debe ocurrir para sintetizar todas las proteínas virales, entre ellas la RdRp para llevar a cabo la replicación viral.

El inicio de la traducción es dependiente del cap 5' presente en el genoma flaviviral, que en conjunto con la unión de proteínas de unión a poli-A (PABP) a secuencias ricas en adeninas que flanquean los DB del 3' UTR, permiten el reclutamiento de factores celulares de iniciación de la traducción (Clyde & Harris, 2006). Al reclutarse la subunidad 40s ribosomal, recorre el 5' UTR desenrollando sus estructuras secundarias hasta encontrar el codón de inicio AUG con ayuda del elemento cHP (Clyde et al., 2008). La traducción del ORF del RNA viral produce una poliproteína cuyos dominios transmembrana inducen su reclutamiento a la membrana del RE, donde es procesada proteolíticamente co- y post-traduccionalmente mediante la actividad proteasa de la proteína NS3 en conjunto con su cofactor NS2B, así como por proteasas celulares como la señal peptidasa, dando origen a las tres proteínas estructurales y diez no estructurales (García-Blanco et al., 2016).

Las regiones de la poliproteína correspondientes a las proteínas C y prM son procesados proteolíticamente de manera coordinada mediante la proteasa viral NS3 y la peptidasa señal en el lumen citosólico y del ER, respectivamente. El procesamiento entre las proteínas prM-E y E-NS1 está mediado únicamente por la peptidasa señal. La escisión entre las proteínas NS1-NS2A requiere una proteasa celular aún desconocida. Los sitios de escisión restantes, NS2A-NS2B y NS2B-NS3, están mediados por la proteasa NS3 en cis, mientras que el procesamiento

entre NS3-NS4A y NS4B-NS5 está mediado por las proteínas NS2B y NS3 en trans. Las proteínas maduras NS4A y NS4B se generan por procesamiento proteolítico en dos sitios por NS2B/NS3 y la peptidasa señal (Barrows et al., 2018).

Replicación del genoma viral en el complejo de replicación

Una vez que se han traducido todos los elementos necesarios para llevar a cabo la replicación viral, el virus induce la formación de complejos de replicación mediante la remodelación de membranas del RE mediada por la proteína viral NS4A. Estos complejos de replicación generan un ambiente favorable para la replicación del genoma viral (Figura 2) (Miller et al., 2007), además de mantener la maquinaria y los productos de la replicación protegidos del reconocimiento por receptores citosólicos como la familia de receptores tipo RIG-I (RLRs) y cGAS; y por exoribonucleasas celulares como XRN1 (Nasirudeen et al., 2011; Pijlman et al., 2008).

La formación del SLA en el 5'UTR crea un fuerte promotor y sitio de unión para la proteína NS5 (Kim et al., 2007). El extremo 3'UTR libre ahora puede aproximarse al 5'UTR y circularizar el genoma mediante interacciones RNA-RNA entre las secuencias complementarias 5'CS-3'CS y 5'UAR-3'UAR dentro o cercanas a las UTR (Figura 1) (Alvarez et al., 2005; Polacek et al., 2009); a este tipo de interacciones RNA-RNA se les ha denominado como interacciones de largo alcance.

La circularización del genoma permite el acercamiento y transferencia de la NS5 al sitio de inicio de la replicación en el 3'SL donde a partir de un dinucleótido pppAG o *priming loop* contenido en la polimerasa, sintetiza *de novo* una cadena complementaria al molde, pero de polaridad negativa (-ssRNA) denominado intermediario replicativo (You & Padmanabhan, 1999). La actividad NTPasa, helicasa y trifosfatasa de la NS3, permiten la liberación del -ssRNA para su posterior uso como molde por la NS5 para la síntesis de múltiples ssRNA+ que conformarán los nuevos genomas virales (Guyatt et al., 2001).

Una vez que ha concluido la replicación del genoma, la actividad trifosfatasa de la NS3 hidroliza un fosfato del primer nucleótido en el extremo 5'. Posteriormente la actividad guanilil-transferasa de NS5, añade un guanosín monofosfato (GMP) y añade un grupo metilo a el N7 con su actividad metiltransferasa, formando el *cap* tipo I (Zhao et al., 2015). El RNA viral replicado es liberado de los complejos de replicación hacia el citoplasma para su traducción o hacia otro compartimento del RE para su ensamblaje en nuevas partículas virales (Welsch et al., 2009).

Ensamblaje de la partícula viral

El ensamblaje está estrechamente coordinado con la replicación, por lo que también ocurre en la membrana del RE (Figura 2) (Welsch et al., 2009). Conforme el RNA replicado es liberado de los complejos replicativos a través de poros de aproximadamente 10 nm, se une con alta afinidad a la proteína C flaviviral (Samsa et al., 2012). Dentro del género *Flavivirus* no se ha descrito una señal específica para la encapsidación del genoma, pero se ha propuesto que puede encontrarse dentro del 3'UTR (Groat-Carmona et al., 2012).

Las interacciones de NS2A con el 3'UTR del genoma viral lo reclutan al sitio de ensamblaje y simultáneamente el complejo de proteasa viral NS2B-NS3 interacciona con las proteínas prM-E para dirigir las proteasas necesarias, al sitio de ensamblaje de la partícula viral (Lobigs & Lee, 2004). De esta forma NS2B-NS3 procesa proteolíticamente la proteína C en la región citoplasmática del RE, mientras que la peptidasa señal del hospedero procesa proteolíticamente la poliproteína C-prM-E en el lumen del RE (Ma et al., 2018).

Después del procesamiento proteolítico, las moléculas de la cápside se dimerizan y, simultáneamente, las proteínas prM y E forman heterodímeros y se trimerizan. Se ha sugerido que durante este proceso la proteína NS3 podría contribuir a la condensación del RNA viral para su empaquetamiento en la NC, para después la NS1 poder asistir su direccionamiento hacia las regiones del RE donde ocurre el *budding* a un pH de 7.2 (I.-M. Yu et al., 2009). Finalmente, la NS3 podría reclutar

la maquinaria de los complejos de clasificación endosomal para el transporte (ESCRT) para permitir la fusión de membranas del RE cuando las NCs han adquirido la envoltura para así ser liberadas hacia el complejo de Golgi (Figura 2) (Thepparit et al., 2019).

Maduración y liberación de la partícula viral

Las partículas flavivirales recién liberadas del RE son inmaduras pues sus heterodímeros prM-E mantienen expuesto el DII de la proteína E donde se encuentra el péptido *pr* protegiendo el péptido fusogénico de una fusión prematura de membranas (Prasad et al., 2017). Cuando el pH en el RE es de 7.2, el virión inmaduro es transportado hacia el TGN por la vía secretora donde el pH desciende a 6 ocasionando la rotación del DII dentro de cada heterodímero prM-E, y cambiando su conformación en 90 dímeros paralelos a la superficie de la membrana (Figura 2) (Zhang et al., 2013). Esto permite la unión del péptido *pr* al DI de la proteína E adyacente, colocando los heterodímeros prM-E en su sitio y exponiendo el sitio de corte entre el péptido *pr* y la proteína M (I. M. Yu et al., 2008).

El procesamiento proteolítico del péptido *pr* de la proteína M es llevado a cabo por la proteasa celular furina, dejando la proteína M adherida a la membrana viral (I. M. Yu et al., 2008). Este rearrreglo de proteínas permite que la membrana adquiera su capacidad de fusión y generar cambios conformacionales a pH ácido, por lo tanto, es un proceso vital para la liberación de partículas potencialmente infecciosas. Por esta misma razón, después del corte de *pr* éste se mantiene unido no covalentemente a la proteína E, previniendo los cambios conformacionales que exponen el péptido fusogénico (I.-M. Yu et al., 2009); sin embargo, al liberar la partícula viral el péptido *pr* se disocia debido al pH neutro del ambiente extracelular (Figura 2) (Junjhon et al., 2010).

Finalmente, para la liberación de la partícula viral madura mediante exocitosis debe ocurrir la fusión de la vesícula transportadora proveniente del TGN con la

membrana plasmática (I.-M. Yu et al., 2009). Durante este proceso se liberan partículas maduras, pero también partículas subvirales, es decir, aquellas que carecen de NC o material genético por lo que no son infectivas. (Zheng et al., 2014; Zybert et al., 2008).

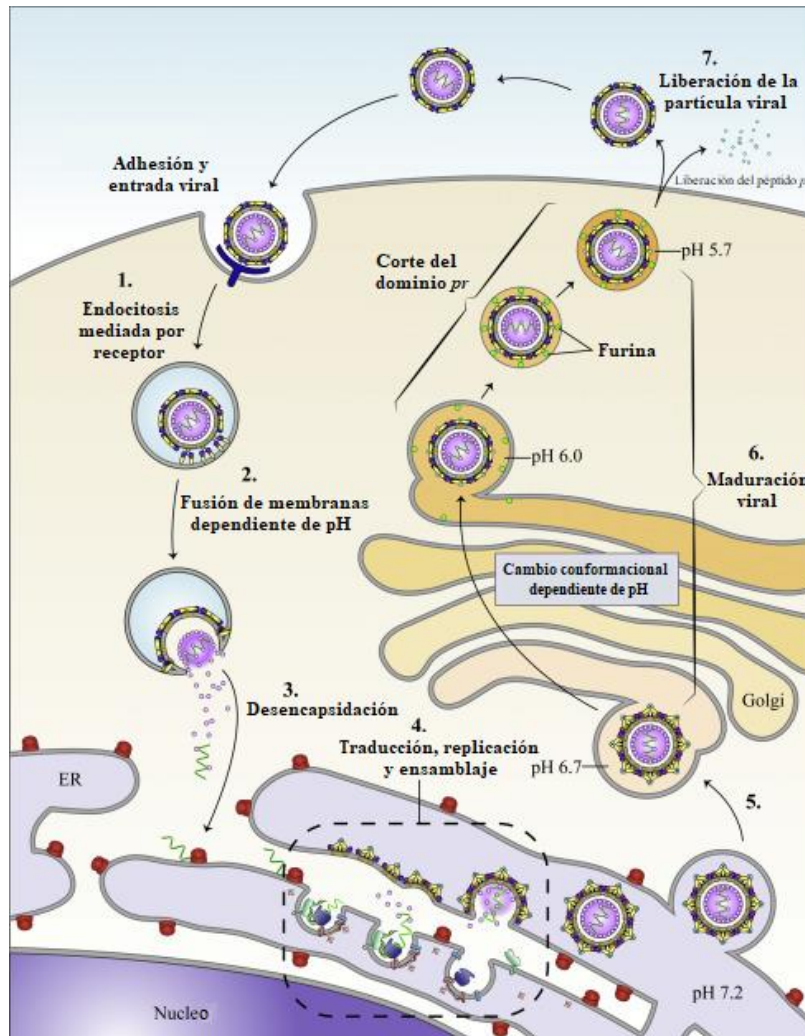


Figura 2. Ciclo de replicación de *Flavivirus*. Al inicio de la infección la partícula viral entra en contacto con los factores de adhesión y receptores celulares. Una vez adherido, el virus se internaliza en la célula mediante endocitosis dependiente o independiente de clatrina (1.) y es colocado en un endosoma. La acidificación del endosoma desencadena cambios conformacionales en la proteína E permitiendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal (2.), conduciendo a la liberación del RNA en el citoplasma (3.). El RNA es transportado hacia complejos de replicación en el ER donde se lleva a cabo la

traducción, replicación y ensamblaje viral (4.). La partícula viral liberada de estos compartimentos es inmadura (5.) por lo que atraviesa la TGN donde se promueve la maduración del virión a través de cambios conformacionales de la proteína E y la escisión del dominio pr de la proteína prM (6.). Finalmente, la vesícula que contiene la partícula viral madura fusiona su membrana con la membrana celular liberándola por exocitosis (7). Recuperada de Nicholls, et al., 2020.

RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA CONTRA *FLAVIVIRUS*

Una de las primeras líneas de defensa celular para controlar o inhibir una infección viral corresponde a la inmunidad innata. La inmunidad innata celular es activada por diversos receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs) localizados en membranas celulares, membranas endosomales o libres en citoplasma (Nasirudeen et al., 2011). Los PRRs vigilan la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que, en el caso de los virus, pueden ser su material genético, intermediarios replicativos o proteínas de envoltura (Diamond et al., 2000).

Se ha descrito que el dsRNA generado durante la replicación de DENV es reconocido por TLR-3 o TLR-7 endosomales, pero mayormente por el gen inducible por ácido retinoico tipo 1 (RIG-I), especializado en el reconocimiento de dsRNA cortos con extremos 5' di- o trifosfatados y por el factor de diferenciación del melanoma tipo 5 (MDA-5) que reconoce dsRNA largos (Figura 3). Ambos receptores se expresan ampliamente en la mayoría de los tejidos y al reconocer el RNA viral por su dominio helicasa, se desencadena su desfosforilación, ubiquitinación y cambios conformacionales que promueven su oligomerización (Zevini et al., 2017).

Esta nueva conformación induce la interacción de RIG-I o MDA-5 con la proteína señalizadora mitocondrial antiviral (MAVS) ubicada en la superficie de la mitocondria, a través de la interacción de los dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD) presentes en las tres proteínas, dicha interacción

induce la transducción de la señal río abajo. MAVS es funcional en su forma multimérica a la cual se reclutan diversas cinasas y proteínas adaptadoras como TRAF3 y TRAF6. A partir de este punto se activan dos vías: la cinasa 1 de unión a TANK (TBK1) y la cinasa ϵ de I κ B (IKK ϵ) que a su vez fosforilan a la familia de factores de transcripción reguladores de interferón (IRF) por ejemplo, IRF3 e IRF7. Una vez fosforilados, homodímeros u heterodímeros de IRF3 y/o IRF7 se traslocan al núcleo donde presentan afinidad diferencial por los diferentes promotores de los genes de interferones tipo I (IFNs-I), induciendo su transcripción. Esta etapa de la respuesta inmunológica innata antiviral se conoce como la vía de señalización activadora de la expresión de los IFNs-I. La segunda vía activada es del complejo de cinasas IKK α / β / γ que reclutan y activan a la familia de factores de transcripción del factor nuclear potenciador de cadenas kappa de células B (NF- κ B) para la transcripción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-18 y TNF- α (Figura 3) (Rehwinkel & Gack, 2020; Zevini et al., 2017).

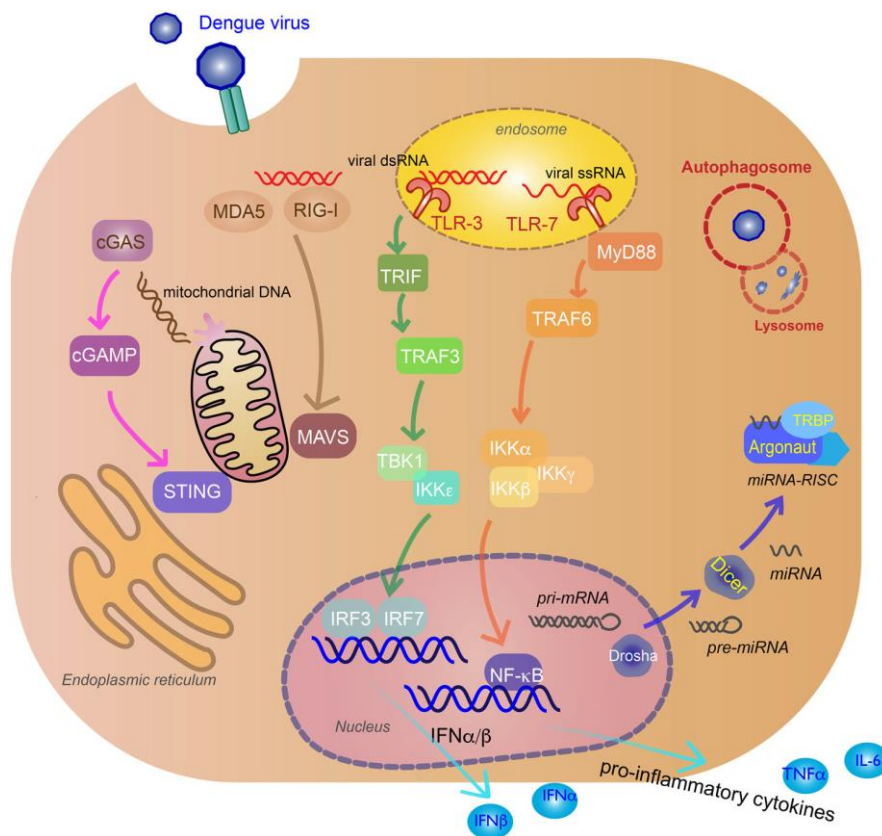


Figura 3. Esquema de la vía de señalización inductora de IFNs-I. La detección de la infección por DENV y ZIKV mediante RLRs (RIG-1/MDA5) o TLR3/7 activa la cascada de señalización para la producción de IFNs-I. Los RLRs activan la proteína MAVS que recluta proteínas adaptadoras de la familia TRAF para el reclutamiento de las cinasas TBK1 e IKKε que fosforilan IRFs para su traslocación al núcleo donde activan la expresión de IFNs-I. Los TLRs endosomales transducen su señal mediante MyD88 y TRIF para la fosforilación de los IRFs mediante cinasas IRAK y/o TBK1 e IKKε. El reclutamiento de TRAFs también induce la fosforilación y liberación de NF-κB a través del complejo de cinasas IKKα/β/γ, induciendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias. El receptor cGAS puede reconocer el daño celular inducido por DENV al reconocer DNA mitocondrial en citoplasma, activando la cascada de señalización para IFNs-I a través de STING localizado en el ER. Recuperado de (Uno & Ross, 2018).

Interferones de tipo I (IFNs-I)

El genoma humano codifica para 17 tipos de interferón tipo I que incluye 13 tipos de IFN-α, IFN-β, IFN-κ, IFN-ε e IFN-ω. En condiciones homeostáticas son expresados a niveles muy bajos, pero aumenta rápidamente al inducirse su expresión mediante diversas vías de señalización, principalmente desencadenadas por receptores de ácidos nucleicos (Rehwinkel & Gack, 2020). Los IFNs-I tienen tres principales funciones: inducir estados antivirales en las células infectadas y vecinas para evitar la diseminación de la infección, modular la respuesta inmunológica innata para promover la presentación antigénica y la función de células *natural killer*, y activar el sistema inmunológico adaptativo (Ivashkiv & Donlin, 2014).

La mayoría de los tipos celulares producen IFN-β, mientras que las células hematopoyéticas, principalmente células dendríticas plasmacitoides, producen predominantemente IFN-α. Ambos activan la vía de señalización efectora de los IFNs-I y comparten el receptor transmembrana IFNAR conformado por un heterodímero de las subunidades IFNAR1 e IFNAR2. El reconocimiento del receptor de la molécula de IFNα/β activa la proteína tirosina-cinasa Janus 1 (JAK1) y la tirosina-cinasa 2 (TYK2) las cuales fosforilan los factores de

transcripción citoplasmáticos transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT1 y STAT2). Ambos se dimerizan y se ensamblan con el factor regulador de interferón (IRF-9) formando el complejo ISGF3. Este factor se trasloca al núcleo donde se une a la secuencia promotora de DNA de elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) que activa la transcripción de genes estimulados por interferón (ISGs) (Figura 4.) (Ivashkiv & Donlin, 2014).

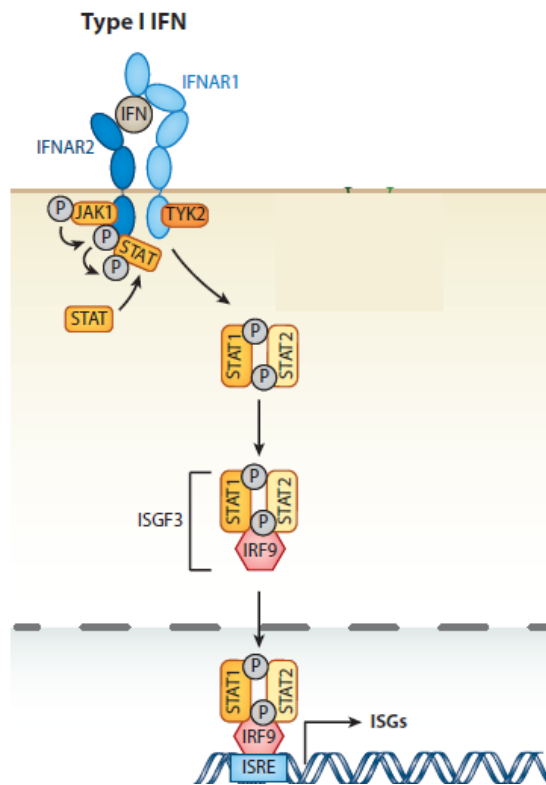


Figura 4. Cascada de señalización efectora de los IFNs-I. Los IFN- α/β extracelulares son reconocidos por su receptor IFNAR activando las cinasas JAK1 y TYK2 encargadas de fosforilar STAT1 y STAT2 para su acoplamiento con IRF9, formando así el complejo ISGF3 que al translocarse al núcleo se une a las secuencias promotoras ISRE para la expresión de ISGs.

Las proteínas codificadas por los ISGs limitan las infecciones virales mediante diversos mecanismos como la inhibición de la transcripción, traducción y

replicación viral, la degradación de su material genético y la alteración del metabolismo de lípidos del cual muchos virus toman ventaja para completar sus ciclos de replicación. En las infecciones por *Flavivirus* se han identificado algunos ISGs con actividad antiviral. Debido a que ZIKV y DENV presentan aspectos similares en su ciclo de replicación algunos de estos ISGs ejercen su actividad antiviral con la misma eficacia para ambos virus, en otros casos el efecto de los ISGs sólo ha sido estudiado en uno de ellos. CH25H evita la entrada y/o fusión de las membranas virales y celulares mediante la modificación de la estructura y propiedades del colesterol, alterando la membrana celular de la que se ayudan las partículas virales para su entrada (Liu et al., 2013); mientras IFITM3 es capaz de alterar el ambiente endosomal impidiendo la fusión de membranas para la liberación del genoma viral al citoplasma (Zhu et al., 2015).

Para irrumpir la traducción IFIT1/2 y PKR se unen a las subunidades del complejo de iniciación de la traducción eucariota 3 (eIF3) (Hui et al., 2003; Jiang et al., 2010); C19orf66 (RyDEN) tiene la capacidad de unirse a proteínas celulares de unión a mRNA utilizadas durante la traducción y directamente al RNA viral, afectando la traducción y replicación de DENV y ZIKV (Suzuki et al., 2016). Viperina podría interactuar directamente con la NS3 y con los complejos de replicación virales, por lo que puede restringir la producción o acumulación temprana de los genomas de DENV y ZIKV; también se ha identificado la inhibición del egreso de las partículas infecciosas (Helbig et al., 2013). RNase L también tiene la capacidad de cortar directamente el gRNA flaviviral (Scherbik et al., 2006).

EVASIÓN DE LA RESPUESTA INNATA ANTIVIRAL POR *FLAVIVIRUS*

Debido a que la respuesta de IFNs-I es una de las primeras líneas de defensa celular antiviral en primates los *Flavivirus* han co-evolucionado con la respuesta inmunológica innata permitiéndoles desarrollar mecanismos para regular o inhibir su activación y señalización (Schlee, 2013). Diversas proteínas virales tienen la capacidad de interferir en diferentes puntos de la cascada de señalización de los interferones, esto para evitar el reconocimiento viral y la inhibición de la replicación, favoreciendo así el establecimiento de la infección productiva en etapas tempranas (Perry et al., 2011; Rodriguez-Madoz, Bernal-Rubio, et al., 2010).

En la vía de activación de la expresión de los IFNs-I se ha encontrado evidencia de que DENV y ZIKV pueden irrumpir el inicio de la señalización desde el reconocimiento del genoma viral por RIG-I, por ejemplo, mediante la 2'-O-metilación en su *cap* 5' llevada a cabo por NS5 (Chang et al., 2016), mediante la unión de la proteína NS3 con la proteína celular 14-3-3ε encargada de la traslocación de RIG-I del citosol al adaptador MAVS en la membrana mitocondrial de células HuH7 y A549 (Chan & Gack, 2016). NS4A de ZIKV se asocia a dos dominios de MAVS evitando su unión a RIG-I y resultando en la represión de la activación de IRF-3 y la disminución de los niveles del mRNA de IFN-β, OAS1 y IFITM1 en células HEK-293T (He et al., 2016). Adicionalmente, la acumulación de RNAs subgenómicos flavivirales (sfRNAs), un producto de la degradación incompleta del RNA genómico flaviviral llevada a cabo por la exoribonucleasa 5'-3' celular XRN1 (Pijlman et al., 2008), de ambos virus ha demostrado reducir la transcripción del gen de *ifnb* a través de la inhibición de la señalización de IFNs-I al interactuar con TRIM25, responsable de ubiquitinar el receptor citoplasmático RIG-1 para el inicio de la señalización hacia el estado antiviral (Manokaran et al., 2015).

La cascada de señalización activada a través de RIG-1 también es irrumpida en diferentes puntos; las proteínas NS4A y NS4B de DENV y la NS1 y NS4B de ZIKV inhiben la fosforilación de TBK1 (Dalrymple et al., 2015), mientras que en células

dendríticas la proteasa NS2B de DENV inhibe la fosforilación de IRF-3 inducida a través de STING, reduciendo así la expresión del gen *ifnb* (Rodríguez-Madoz, Belicha-Villanueva, et al., 2010), en el caso de ZIKV la proteína NS5 se une directamente a IRF-3. En cooperación con este mecanismo de evasión, la señalización a través del receptor cGAS puede ser inhibida mediante la unión de NS2B de DENV dirigiendo el receptor a su degradación en lisosomas celulares de células dendríticas primarias humanas derivadas de monocitos (MDDCs), mientras que ZIKV puede inducir la proteólisis de cGAS a través de la unión de NS1 a USP8 (Aguirre et al., 2017).

En la vía de la actividad antiviral de los IFNs-I el DENV y ZIKV también interfieren a través de sus proteínas. NS2A, NS4A y NS4B de DENV disminuyen la fosforilación de STAT1 impactando en una menor expresión del gen *ifnb* en células A549 (Munoz-Jordan et al., 2003), mientras que NS5 de ZIKV y DENV media la disminución de los niveles de STAT2 al inducir su unión a la ligasa E3 que lo dirige al proteasoma celular para su degradación (Ashour et al., 2009). Así mismo, en esta vía la interacción del sRNA de DENV con las proteínas celulares G3BP1, G3BP2 y CAPRIN1 tiene la capacidad de regular negativamente su función reguladora de la traducción de mRNAs de ISGs, como IFITM2 y PKR, protegiendo así los replicones del virus de la respuesta de IFN- β (Bidet et al., 2014).

DIVERSIDAD GENÉTICA EN VIRUS DE RNA

Los virus de RNA son más diversos genéticamente que los de DNA, principalmente debido a las altas tasas de mutación de las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) entre 10^{-2} a 10^{-5} mutaciones por nucleótido copiado por ciclo de replicación (Sanjuán & Domingo-Calap, 2016). Adicionalmente, su carencia de actividad exonucleasa 3'-5' le impide la corrección de errores, a diferencia de las DNA polimerasas (Sanjuán & Domingo-Calap, 2016; Steinhauer et al., 1992).

Hipótesis de cuasiespecies en virus de RNA

La hipótesis de cuasiespecies ha sido útil para explicar la dinámica evolutiva de los virus de RNA. Debido a la baja fidelidad de las RdRp, durante la replicación viral se generan mutaciones aleatorias en los genomas generados a partir del genoma viral inicial, dando origen a un espectro de variantes del genoma relacionadas en su secuencia, pero diferentes entre sí, a éstas se les conoce como cuasiespecies; estas cuasiespecies compiten entre sí durante la infección en el hospedero contribuyendo a las características de la población viral (Lauring & Andino, 2010; Castro et al., 2005).

Las cuasiespecies continuamente se encuentran bajo la presión de la selección natural la cual, cuando es eficiente, elimina mutaciones potencialmente deletéreas, de esta manera contribuye a la evolución y adaptación de los virus (Weaver et al., 2021). Durante los procesos de selección las poblaciones presentan diferente capacidad de sobrevivencia y reproducción de un organismo, es decir, su capacidad de adaptación a su ambiente, a esta capacidad se le conoce como *fitness*. En el contexto de una infección viral las características fisiológicas e inmunológicas del hospedero seleccionan diferentes cuasiespecies virales (Kurosu, 2011), por lo que el *fitness* de una cuasiespecie se ve reflejado en su capacidad de replicación, tropismo celular, evasión del sistema inmunológico, transmisibilidad, entre otros (Lauring & Andino, 2010).

A pesar de que la selección natural tiende a seleccionar las variantes con mayor *fitness*, a la par se seleccionan variantes cuyas mutaciones no tienen un efecto sobre el fenotipo viral. Entre estas cuasiespecies podrían encontrarse genomas con mutaciones neutrales o deletéreas que podrían establecerse en la población a pesar de no haber sido presionadas por la selección natural (Weaver et al., 2021). La permanencia de estas cuasiespecies entre la población podría favorecer su adaptación a cambios rápidos en el ambiente.

La respuesta inmunológica o barreras biológicas del hospedero humano se consideran presiones de selección que ocasionan un efecto “cuello de botella” en las poblaciones virales, ya que reducen la diversidad de cuasiespecies que establecen la infección. Sin embargo, la alta tasa de mutación de la polimerasa permite que rápidamente se restablezca la diversidad genética de la población viral para su posterior transmisión (Sim et al., 2015; Weaver et al., 2021). Por lo tanto, para los arbovirus la alta tasa de mutación de la polimerasa (10^{-4} para *Flavivirus* vs 10^5 o 10^6 para *Rhinovirus* y *Tobamovirus*, respectivamente) (Caldwell et al., 2022; Sanjuán & Domingo-Calap, 2016) les confiere una ventaja evolutiva al generarse rápidamente cuasiespecies con diferente *fitness* que se enfrentan a diferentes ambientes en los ciclos de transmisión (Lauring & Andino, 2010). En cada hospedero podrían seleccionarse cuasiespecies con diferentes características y diferente *fitness* (Sim et al., 2015), aquellas que presenten menor *fitness* en un hospedero podrían presentar uno más alto en un ambiente diferente; de aquí la importancia de la diversidad genética en una población viral (Kurosu, 2011).

A pesar de que se ha descrito la diversificación genética del genoma flaviviral durante la infección del hospedero, así como la selección diferencial de estas variantes durante los cambios de hospedero entre el mamífero y el vector (Sim et al., 2015), se desconocen los mecanismos que explican la selección positiva y negativa de las variantes virales durante la adaptación al hospedero. Se ha observado que la adaptación de DENV-2 a células humanas y de mosquito está asociada con la diversificación de la secuencia en el 3'UTR flaviviral por lo que la

especialización de estructuras en esta región atribuye una mayor adaptación al hospedero y que ciertas mutaciones pueden ser benéficas en un hospedero, pero deletéreas en otro (Villordo et al., 2015).

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL HOSPEDERO HUMANO

Recientemente se ha buscado describir la variabilidad genética entre individuos humanos. Entre todas las poblaciones del mundo existe variación genética, denominada variación común o ancestral, sin embargo, estudios recientes han identificado polimorfismos con origen reciente que se encuentran limitados a regiones geográficas específicas y que son responsables de rasgos fenotípicos y riesgos para la salud en determinada población (Aguilar-Ordoñez et al., 2021).

Entre la población mexicana se han realizado estudios que evalúan la variación genética entre poblaciones; Moreno-Estrada y colaboradores reportan que entre las poblaciones indígenas de México hay estratificación genética a un grado comparable a la diversidad entre dos regiones continentales diferentes. En este estudio, analizaron patrones de variación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) autosómicos en el genoma de individuos mexicanos nativos de 20 grupos indígenas y mestizos en la mayoría de las regiones geográficas de México. Mediante análisis de componentes principales (PCA) observaron que las poblaciones de africanos y europeos se diferencian genéticamente, pero de igual manera se diferencian las poblaciones indígenas dentro de México agrupándolas en *clusters* o agrupaciones que tienen aislamiento genético en ciertas regiones geográficas, pero manteniendo relación genética mexicana entre ellas (Moreno-Estrada et al., 2014).

De acuerdo con lo observado por Moreno-Estrada y colaboradores, los patrones de ascendencia en la población mexicana podrían influir significativamente sobre las diferencias entre mediciones clínicas de la función pulmonar. Estos resultados sugirieron que la diversidad genética que alberga nuestra población podría tener

implicaciones importantes sobre diversos fenotipos biomédicos importantes para la misma población (Moreno-Estrada et al., 2014).

Recientemente, en un estudio realizado por Aguilar-Ordóñez y colaboradores, al analizar el genoma completo de individuos de 27 grupos indígenas a lo largo del país, identificaron una enorme cantidad de variantes de un solo nucleótido (SNVs) y señales de selección positiva en secuencias promotoras y potenciadoras de genes relacionados a la salud, así como genes de vías relacionadas con la respuesta inmunológica, como el de *Ikbke*, una cinasa de NFκ-B involucrada en la señalización de la respuesta antiviral (Aguilar-Ordoñez et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, los IFNs-I son de las primeras citocinas en ser producidas después de la infección viral por lo que el análisis del fondo genético del hospedero humano y su relación con las diferencias en la activación de la vía de señalización de IFNs-I ha sido de gran interés, por su potencial influencia en la susceptibilidad natural a infecciones virales y a la severidad de las presentaciones clínicas durante la infección. Este tipo de variantes o SNPs se han descrito naturalmente en pacientes infectados con diferentes virus y para múltiples genes de la vía de IFNs-I, por ejemplo en pacientes europeos con infección por virus de la hepatitis C (HCV) se identificaron SNPs en el gen *IFIH1* (o MDA-5) que correlacionaron con la rápida resolución de la enfermedad, además su sobreexpresión en células HEK 293, contribuyó a una mayor supresión de la replicación del virus y mayor expresión de ISGs (Hoffmann et al., 2015).

Entre los *Flavivirus* se ha identificado que en una cohorte de individuos norteamericanos, la presencia de SNPs en los genes *Irf3* y *Mx1* se asocian más significativamente con una infección sintomática que con una infección asintomática por WNV. Además, identificaron un SNP en *Oas1* (un ISG antiviral) asociado significativamente con el mayor riesgo de presentar encefalitis o parálisis por WNV en comparación con los que presentaron únicamente fiebre y/o meningitis por el mismo virus. Estos resultados evidencian indirectamente la modulación de la enfermedad de WNV a través de la vía de IFNs, influyendo en el

riesgo de cursar una infección sintomática y de la progresión de la enfermedad dependiendo de las características genéticas del individuo (Bigham et al., 2011).

En otro estudio realizado por Sakuntabhai y colaboradores analizaron tres cohortes independientes de niños tailandeses hospitalizados por diferente severidad de la enfermedad del dengue. Entre los niños identificaron 40 polimorfismos para el gen *CD209* el cual forma parte del promotor del receptor DC-SIGN1. Entre estos polimorfismos identificaron que en el polimorfismo DC-SIGN1-336 los genotipos GG y GA se asociaban significativamente con un mayor riesgo de fiebre hemorrágica en comparación con el riesgo de fiebre del dengue. Además, demostraron que la variación de la base G en la posición -366 disminuye la actividad promotora del gen. La alteración de su actividad promotora en la expresión de DC-SIGN1 podría resultar en una menor susceptibilidad a la infección de las células dendríticas en las primeras etapas de la infección (Sakuntabhai et al., 2005).

Para el caso de infecciones por ZIKV, Santos y colaboradores compararon SNPs en diversos genes de madres brasileñas que dieron a luz bebés con síndrome congénito asociado a Zika con madres que dieron a luz bebés sanos a pesar de su exposición al virus del Zika, identificando una asociación entre un SNP en el gen de *Tlr3* y el aumento en el riesgo de microcefalia causada por el ZIKV, así como un polimorfismo en *Tnfa* asociado a una menor producción de éste, derivando en microcefalia grave en los infantes. Estos resultados sugieren que la disminución en la producción de IFNs-I y de la respuesta inflamatoria en las mujeres embarazadas infectadas con ZIKV y sus bebés podría derivar en el control deficiente de la infección favoreciendo la viremia y el daño al sistema nervioso central de los infantes (Santos et al., 2019)

Entre la población mexicana también se han identificado SNPs asociados a la susceptibilidad de la infección por virus de RNA. Por ejemplo un polimorfismo en el gen *Oas1* da como resultado la expresión de isoformas de la proteína OAS1 de mayor peso molecular pero menor actividad enzimática, que podrían hacer menos eficiente la respuesta innata antiviral y, por lo tanto, más susceptibles a los

individuos a la infección por virus de RNA (Sánchez-González et al., 2021). En particular para DENV, en una cohorte de 138 pacientes mexicanos con fiebre de dengue (DF) y 31 pacientes con fiebre hemorrágica de DENV (DHF) se identificó que el alelo A del SNP del gen de *Tnf* se distribuía significativamente con mayor frecuencia entre los pacientes con DHF que con DF. En contraste, los SNPs en otros genes como *CD209*, *JAK1*, *CTLA4* e *IFNL3* se presentaron con una distribución similar entre ambos grupos de pacientes (Vargas-Castillo et al., 2018).

En conjunto, estos estudios evidencian que la variabilidad genética en elementos de la respuesta inmunológica innata de los hospederos en diferentes regiones geográficas podría determinar la eficiencia y duración de la respuesta inmunológica antiviral, repercutiendo en la severidad de las manifestaciones clínicas, así como en las variantes de *Flavivirus* seleccionadas en sus poblaciones.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Existe evidencia del impacto de la selección de variantes de DENV en la intensidad y severidad de brotes epidémicos, una de las más contundentes es la evidenciada para la dinámica epidemiológica de DENV-2 en Puerto Rico, donde se ha realizado un seguimiento de circulación de los serotipos DENV. En estos estudios se ha observado que DENV-2 ha circulado continuamente, con fluctuaciones en su predominancia entre 1986 y 2007. Estas fluctuaciones están ligadas a la diversidad genética intra-serotipo, particularmente a nivel del genotipo Asiático-Americano, en el que entre 1986-1995 predominaban variantes del clado DENV PR-1 hasta ser desplazadas epidemiológicamente por el grupo de variantes del clado DENV PR-2B del mismo genotipo, dando origen a un nuevo brote de 1995-2007 (Manokaran et al., 2015; McElroy et al., 2011).

Bajo esta premisa, Manokaran y colaboradores utilizaron aislados virales de ambos clados e infectaron células humanas HuH-7 y monocitos primarios con el objetivo de identificar un potencial determinante viral asociado al mayor *fitness* presente en los aislados del clado PR-2B, pero ausente en los aislados del clado PR-1. Se observó que las células infectadas con aislados de DENV PR-2B presentaron menor acumulación del mRNA del gen de *ifnb* debido a la inhibición de la señalización de IFNs-I por la interacción del sfRNA con TRIM25 reduciendo la señalización hacia la transcripción de este gen y con él la respuesta antiviral dependiente de IFNs-I en etapas tempranas de la infección, permitiendo la viremia en el hospedero y su propagación (Manokaran et al., 2015). Esta es la única evidencia donde se ha correlacionado la presentación clínica con la capacidad de evadir la respuesta inmunológica comparando aislados de diferentes brotes epidémicos.

JUSTIFICACIÓN

Entre la población mexicana hay importantes diferencias genéticas. Las variaciones en genes que codifican para moléculas efectoras de la respuesta inmunológica innata podrían repercutir en su función, por lo que la posible diversidad de respuestas antivirales entre la población mexicana seleccione variantes genéticas de los *Flavivirus* DENV y ZIKV diferentes a las reportadas en otras regiones endémicas. Esta diversidad genética viral podría evidenciarse a través de distintos fenotipos evasores de IFNs-I.

La epidemiología actual del DENV en México se limita al diagnóstico clínico de la enfermedad y ocasionalmente en la identificación del serotipo, mientras que la del ZIKV consiste en su identificación y los posibles casos de síndrome de Guillain-Barré y síndrome congénito asociados a Zika; sin embargo, no se describe el fenotipo de las variantes genéticas seleccionadas en el país. Determinar si la capacidad de evadir la respuesta de IFNs-I de *Flavivirus* circulantes en México es variable durante brotes epidémicos y correlaciona con la severidad de las manifestaciones clínicas, podría permitir el diseño de protocolos de vigilancia epidemiológica para la detección de variantes potencialmente virulentas en la población mexicana.

HIPÓTESIS

El fenotipo evasor de IFNs-I será diferente entre aislados de *Flavivirus* obtenidos de individuos mexicanos durante el brote de 2019 en la ciudad de Oaxaca y este fenotipo correlacionará con la severidad de la presentación clínica de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el fenotipo evasor de la respuesta de IFNs-I en un modelo celular infectado con aislados de *Flavivirus* mexicanos, y su correlación con la clasificación clínica determinada en los pacientes incluidos en el estudio de los aislados virales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y amplificar *Flavivirus* en cultivo celular a partir de muestras de suero de pacientes del estado de Oaxaca, con diagnóstico clínico y serológico de DENV en etapa febril.
2. Cuantificar el título viral de los aislados mexicanos de *Flavivirus* por formación de unidades formadoras de placa (PFUs).
3. Comparar la cinética de replicación de los aislados mexicanos de *Flavivirus* en la línea celular Vero.
4. Comparar la susceptibilidad a la respuesta antiviral dependiente de IFNs-I entre aislados mexicanos de *Flavivirus* en un modelo celular de estimulación con IFN- α recombinante.
5. Comparar la cinética de replicación de los aislados mexicanos de *Flavivirus* en la línea celular de origen hematopoyético humano (U937) y fibroblastos dérmicos humanos (HFF-1).
6. Correlacionar la sensibilidad a IFNs-I de los aislados mexicanos de *Flavivirus* con la clasificación clínica de la enfermedad en los pacientes de los que fueron aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES

Línea celular Vero

La línea celular Vero consiste en células epiteliales de riñón de mono verde (*Chlorocebus aethiops*). Tienen una delección en el cromosoma 12 que ocasiona la pérdida de un grupo de genes de IFNs-I por lo que son altamente susceptibles y permisivas a infecciones virales. Son ampliamente utilizadas para la amplificación y ensayos de titulación viral de *Flavivirus* donde presentan la formación de placas líticas (WHO, 2007). Estas células son adherentes y se mantienen en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (Biowest) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Biowest) entre 3 y 10%, y antibiótico al 1% (Biowest), en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Línea celular U937

La línea celular U937 consiste en células humanas de origen hematopoyético obtenidas de un paciente con linfoma histiocítico. Estas células son monocitos, precursores de macrófagos. Esta clona expresa de manera estable DC-SIGN por lo que son artificialmente permisivas a la infección por *Flavivirus*. Son células no adherentes que se mantienen en medio RPMI suplementado con FBS entre 5 y 10%, y antibiótico al 1%, en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Línea celular HFF-1

Esta línea celular corresponde a fibroblastos de piel sana humana, cuya expresión de IFN- β es muy alta (Kurane et al., 1992). Son células adherentes que se mantienen en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con FBS (Biowest) entre 5 y 15% y antibiótico al 1%, en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

MUESTRAS CLÍNICAS

Se utilizaron 11 muestras de sueros donadas por el laboratorio de análisis clínicos OaxacaLab, ubicado en la ciudad de Oaxaca. Estas muestras fueron recolectadas de pacientes con signos, síntomas y diagnóstico serológico de infección por DENV durante el año 2019.

La toma de muestra se realizó dentro de los primeros tres a cinco días iniciados los síntomas (etapa febril – inicio de la etapa crítica) ya que la mayor carga de viremia en el hospedero ocurre dentro de los primeros cinco días, esto facilita su detección molecular a partir del suero y favorece el aislamiento viral en el laboratorio (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009). Adicionalmente, en el laboratorio de análisis clínicos se les realizó una prueba rápida de inmunocromatografía para la detección de la proteína viral NS1, y para IgM e IgG anti-DENV para confirmar la infección. Las muestras de suero fueron mantenidas en ultracongelación a -70° C y posteriormente transportadas en nitrógeno líquido al laboratorio de Biología Molecular e Inmunología de arbovirus en la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) donde se crioalmacenaron en esta misma condición.

De los pacientes de los que provienen los sueros se conoce sexo y edad, y se les realizó una biometría hemática que incluye resultados de fórmula roja como cantidad de eritrocitos, hemoglobina, porcentaje de hematocrito, volumen globular medio, hemoglobina globular media, concentración media de hemoglobina globular, número de plaquetas y volumen plaquetario; y resultados de serie blanca como leucocitos totales, cantidad absoluta y porcentaje de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. De esta información se consideró el conteo plaquetario, leucocitario y porcentaje de hematocrito para clasificar las muestras en dos grupos: dengue no grave (DNG) o dengue con signos de alarma/dengue grave (DCSA + DG) conforme a los parámetros establecidos por la OMS en 2009.

Se clasificó como DNG a las muestras positivas para NS1 y/o IgM para DENV que no presentaran anomalías hemáticas o únicamente leucopenia con número de leucocitos menor a 4,400/ μ L. Las muestras positivas para NS1 y/o IgM para DENV con hematocrito alto y/o trombocitopenia menor a 150,000 plaquetas/ μ L pero mayor a 100,000 plaquetas/ μ L se clasificaron como DCSA. Las muestras con trombocitopenia menor a 100,000 plaquetas/ μ L se clasificaron como DG.

AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO VIRAL

Las muestras serológicas fueron utilizadas para la amplificación de las posibles partículas virales presentes en ellas mediante pases ciegos en placas para cultivo celular de 6 pozos con monocapas de células Vero a confluencia de 70-80%. Cada monocapa se inoculó con una dilución 1:40 del suero de una muestra diferente en RPMI suplementado. Se mantuvo un pozo por placa sin inocular como control negativo. Esta inoculación se mantuvo en un volumen de íntimo contacto entre células y la dilución de la muestra durante 1 hora con movimiento cada 15 minutos a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, en cada pozo se completó a un volumen final de 3mL con RPMI suplementado y se incubaron en las mismas condiciones hasta por 8 días.

Estas inoculaciones fueron monitoreadas para observar la presencia de efecto citopático causado por las potenciales partículas virales presentes en el suero. El efecto citopático en células Vero se evidencia mediante cambios en la morfología o lisis celular que ocasiona el desprendimiento de la monocapa del sustrato. En caso de observar efecto citopático en un 30-40% de la monocapa, se recuperó todo el sobrenadante; de no ser así, la infección se mantuvo hasta 8 días para permitir la mayor producción posible de partículas virales.

El sobrenadante recuperado se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C para descartar residuos celulares, se añadió sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) como criopreservador, se fraccionó y almacenó a -70°C. Este proceso se conoce como cosecha.

Una fracción del sobrenadante de la primera cosecha fue utilizado para inocular una nueva monocapa de células Vero, siguiendo el mismo protocolo y criterios de infección, monitoreo y cosecha. Cada vez que la muestra entra en contacto con una monocapa no infectada se le considera como un “pase”. De esta forma a cada muestra se le realizaron hasta 8 pases ciegos.

TITULACIÓN VIRAL POR UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (PFUs)

Los ensayos de titulación vial se realiz para la cuantificación de placas: áreas localizadas de la monocapa celular donde inicia la infección productiva (WHO, 2007). Para la titulación de los sobrenadantes con *Flavivirus* se inoculó una monocapa de células Vero con diluciones decimales seriadas de los sobrenadantes de las muestras amplificadas, la cual se mantuvo durante una hora con movimiento cada 15 minutos a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se añadió medio RPMI suplementado con metilcelulosa (Sigma) al 1.25%, 2% de FBS y 1% de antibiótico; el estado semisólido de este medio limita la infección en áreas localizadas de la monocapa celular permitiendo la formación de las placas.

Después de 5 días se retiró el medio semisólido, se fijaron y permeabilizaron las células con metanol al 85%. La inmunocitoquímica se realizó añadiendo una dilución 1:4000 de anticuerpo primario 4G2 (dirigido al péptido fusogénico flaviviral donado por el Dr. Stephen Whitehead, NIH, MD, USA) el cual se incubó durante 1 hora a 37°C con movimiento cada 15 minutos, seguido de una dilución 1:4000 de anticuerpo secundario contra IgG de ratón acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP-KPL) en las mismas condiciones. Finalmente, las placas formadas y marcadas se revelaron añadiendo tetrametilbencidina (TMB-KPL) (Seracare) cuya oxidación por la HRP induce su precipitación lo que permite visualizar de placas teñidas en color azul. Con el número total de placas se calcula el título viral en unidades formadoras de placa (PFU)/mL de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

Donde: x = título viral PFU/mL

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

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

El número de PFUs/mL que se calcula a través de esta técnica se reporta en la magnitud de potencias de 10, por lo que la expresión e ilustración de estos datos resulta más eficiente si se utiliza la escala logarítmica base 10. Esto significa que, un título viral de 7 log equivale a 1×10^7 PFUs/mL, es decir 10000000 PFUs/mL. Cada unidad de logaritmo equivale a 10 veces más el número de PFUs en escala decimal, por ejemplo $3.4 \log = 2,511.88$ PFUs/mL, mientras que $4.4 \log = 25,118.8$ PFUs/mL.

Opcionalmente a la tinción mediante inmunocitoquímica, se evidenció la formación de placas mediante una técnica de contraste entre las placas y la tinción de la monocapa celular. Para ello, después de retirar el medio semisólido, se añadió colorante rojo neutro (Goldbio) al 3.2% y se incubó durante 24 horas a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. El rojo neutro tiñe el núcleo y se acumula en los lisosomas de células sanas, por lo que las células infectadas permanecen incoloras evidenciando las placas formadas en la monocapa celular. Con el número total de placas se calculó el título viral en unidades formadoras de placa (PFU)/mL mediante la fórmula anterior.

COMPARACIÓN DEL FENOTIPO EVASOR DE IFNs-I ENTRE AISLADOS MEXICANOS DE *FLAVIVIRUS*

Una vez titulados, los aislados virales obtenidos se utilizaron para la infección de células Vero previamente estimuladas con IFN- α A/D recombinante universal (Sigma-Aldrich); este IFN consiste de un híbrido de los IFN α A y α D expresado en *E. coli* y cuya actividad se ha demostrado en múltiples células de mamíferos.

El experimento se realizó como se describe a continuación. En placas para cultivo celular, se sembraron 100,000 células Vero por pozo, cada uno fue estimulado con diferente concentración: sin IFN- α , 1 unidad internacional (IU)/mL, 10 IU/mL o 100 IU/mL de IFN- α resuspendidas en medio RPMI suplementado al 3% con FBS. Esta estimulación se mantuvo por 16 horas en incubación a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se retiró el medio con IFN- α y se infectaron las monocapas con cada aislado viral a una multiplicidad de infección de 0.1 en incubación a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% y durante 1 hora con movimiento cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el inóculo viral y se añadió nuevamente medio RPMI con su concentración de IFN- α correspondiente. Se tomaron alícuotas del sobrenadante de cada tratamiento cada 24 horas durante 6 días y se almacenaron a -70 °C. El volumen tomado se repuso con la misma cantidad de RPMI adicionado con su concentración correspondiente de IFN- α . El experimento se realizó por duplicado para cada tratamiento. Finalmente, las alícuotas recuperadas durante la infección y tratamiento con IFN- α se titularon por PFUs mediante el protocolo de inmunocitoquímica o tinción celular por contraste para analizar la cinética de infección de cada aislado viral con los diferentes tratamientos de IFN- α .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de los títulos virales obtenidos de la infección bajo los diferentes tratamientos con IFN- α , se calculó el porcentaje de reducción de la infección. Se consideró el título viral de cada aislado sin IFN- α como el 100% de la infección, y a partir de este dato se calculó el porcentaje de infección con cada virus bajo cada tratamiento durante los 6 días de la cinética. Con estos datos se calculó el porcentaje de reducción de la infección mediante la siguiente fórmula:

$$\text{\% de reducción de infección} = 100\% - \text{\% infección en cada tratamiento}$$

Los porcentajes de reducción de la infección fueron analizados mediante ANOVA de dos vías y múltiples comparaciones con corrección de Bonferroni, considerando un $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE AISLADOS MEXICANOS FLAVIVIRALES

Para iniciar la amplificación viral fueron seleccionadas 11 muestras positivas a NS1 y/o positivas a IgM o IgG, ya que su detección durante los primeros 5 días de la infección son indicadores de etapa tempranas de la enfermedad, donde se sobrelapan parcialmente con la viremia en sangre, por lo tanto, favorece el aislamiento viral (Figura 5) (OMS, 2009; Guzman, et al., 2016).

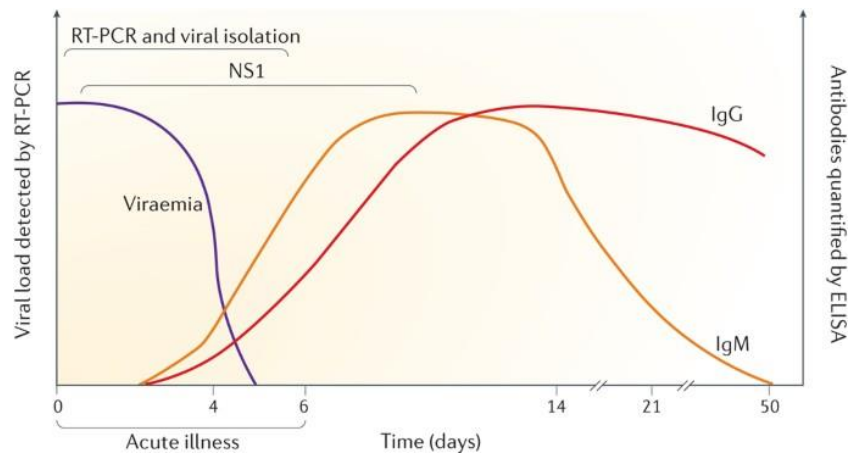


Figura 5. Niveles de viremia, IgM e IgG a lo largo de la infección por DENV. Durante los primeros cuatro días de la etapa febril de la enfermedad la viremia en sangre alcanza sus mayores niveles por lo que el diagnóstico molecular puede llevarse a cabo mediante RT-qPCR o el aislamiento viral, así como mediante la detección de la proteína viral NS1 secretada a circulación sanguínea. Cerca del final de la etapa febril, los anticuerpos IgM e IgG anti-DENV comienzan a ser cuantificables mediante ensayos de ELISA y alcanzan sus máximos valores hasta casi 2 semanas después, posteriormente los anticuerpos IgM comenzarán a decrecer mientras los IgG permanecerán detectables hasta por 10 meses o idealmente de por vida. Tomado de Guzman, M. et al., 2016.

De las 11 muestras, cinco correspondieron a pacientes del sexo femenino y cuatro al sexo masculino. Todas fueron positivas a NS1 y negativas a IgG; únicamente la muestra 10 fue positiva a IgM (Tabla 1). De acuerdo con los criterios establecidos

y la información incluida en la biometría hemática se clasificaron 4 muestras como DNG y 5 muestras como DCSA + DG (Tabla 2).

Tabla 1. Datos demográficos y serológicos de las muestras utilizadas.

Muestra	Sexo	Edad	NS1	IgM	IgG
10	M	5 años	+	+	-
13	F	46 años	+	-	-
14	N/A	N/A	+	-	-
17	N/A	N/A	+	-	-
19	F	31 años	+	-	-
31	F	35 años	+	-	-
35	M	56 años	+	-	-
44	M	20 años	+	-	-
46	M	31 años	+	-	-
49	F	31 años	+	-	-
51	M	15 años	+	-	-

Tabla 2. Datos biométricos de las muestras y clasificación de la forma clínica de la enfermedad del dengue bajo los criterios de la WHO 2009.

Muestra	Hematocrito %	Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	Leucocitos totales $\times 10^3/\mu\text{L}$	Anomalia hemática	Clasificación *
10	45.9	234	7.8	Hematocrito alto	DCSA
13	44.7	153	3.42	Leucopenia	DNG
14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
17	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
19	43.5	123	6.36	Trombocitopenia	DCSA
31	39.3	297	8.01	-	DNG
35	47.9	330	7.94	-	DNG

44	49	126	2.27	Leucopenia y trombocitopenia	DCSA
46	45.2	73	3.86	Leucopenia y trombocitopenia	DG
49	42.2	66	6.5	Trombocitopenia	DG
51	42.8	240	5.56	-	DNG

**Dengue no grave (DNG), Dengue con signos de alarma (DCSA) y Dengue grave (DG).*

Pases ciegos y presencia de efecto citopático

Durante la amplificación viral de las 11 muestras de suero, la mayoría de los pases se cosecharon a los 6 o 7 días posteriores a la infección (dpi) a pesar del sobrecrecimiento celular y de no observar efecto citopático evidente (Figura 6B). En las monocapas inoculadas con algunas muestras, por ejemplo, la número 35 se observó efecto citopático de lisis celular desde el primer pase (Figura 6F). Otras muestras, como la 10, comenzaron a mostrar efecto citopático hasta el pase seis, aunque poco evidente (Figura 6C). Debido a esto, la amplificación viral se enfocó en las muestras en las que se observó mayor indicio de efecto citopático; estas correspondieron a las muestras 10, 17, 19 y 35 (Figura 6C-F). Estas muestras se amplificaron hasta con ocho pases ciegos.

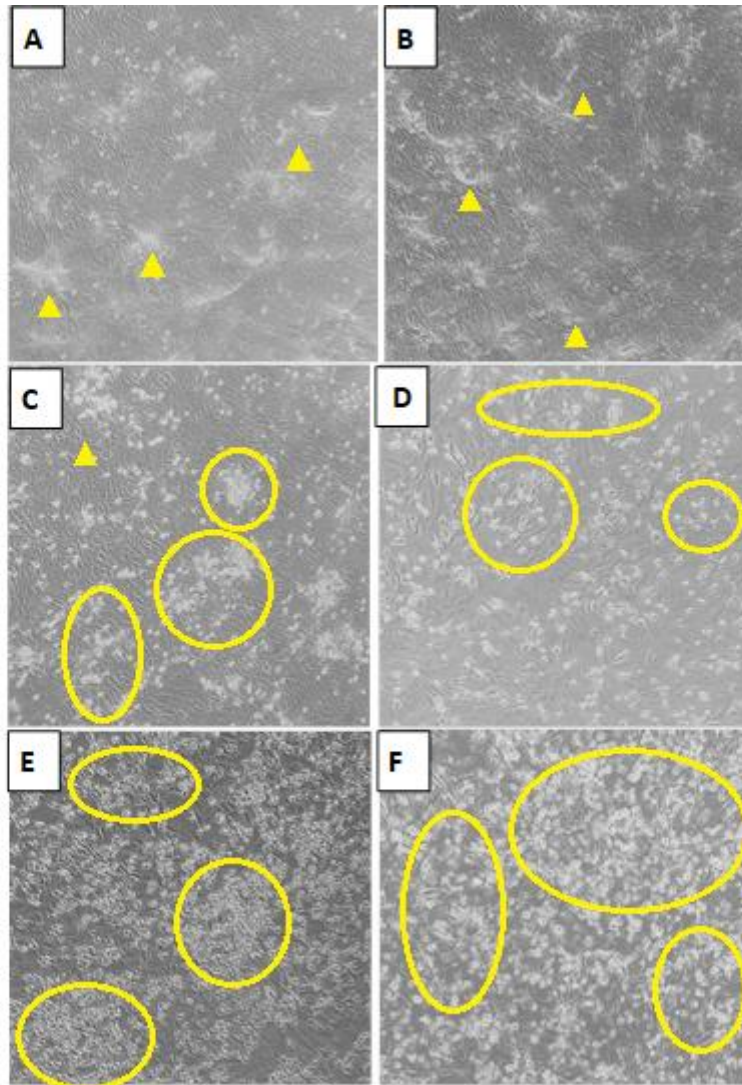


Figura 6. Inoculación de células Vero con sobrenadantes de muestras serológicas con pases ciegos en cultivo celular. A) Control negativo: sin infección y con sobrecrecimiento (señalado con triángulos) a 6dpi. B) Sobrecrecimiento celular en inoculación con muestra 13 pase 3 a 6dpi. C-F) Efecto citopático (señalado en círculos) en infección con C) muestra 10 pase 6 a 6dpi, D) muestra 17 pase 6 a 6dpi, E) muestra 19 pase 7 a 7dpi y F) muestra 35 pase 1 a 3dpi.

Títulos virales de las muestras amplificadas

En el pase ocho de la amplificación viral de las muestras 10, 17, 19 y 35 se logró la cuantificación de su título viral (Figura 7). El título del aislado obtenido de la muestra 10 (Oax10) fue de 5.1 log, el del aislado 17 (Oax17) 4.8 log, el del aislado 19 (Oax19) 4.2 log, y el del aislado 35 (Oax35) 4.3 log.

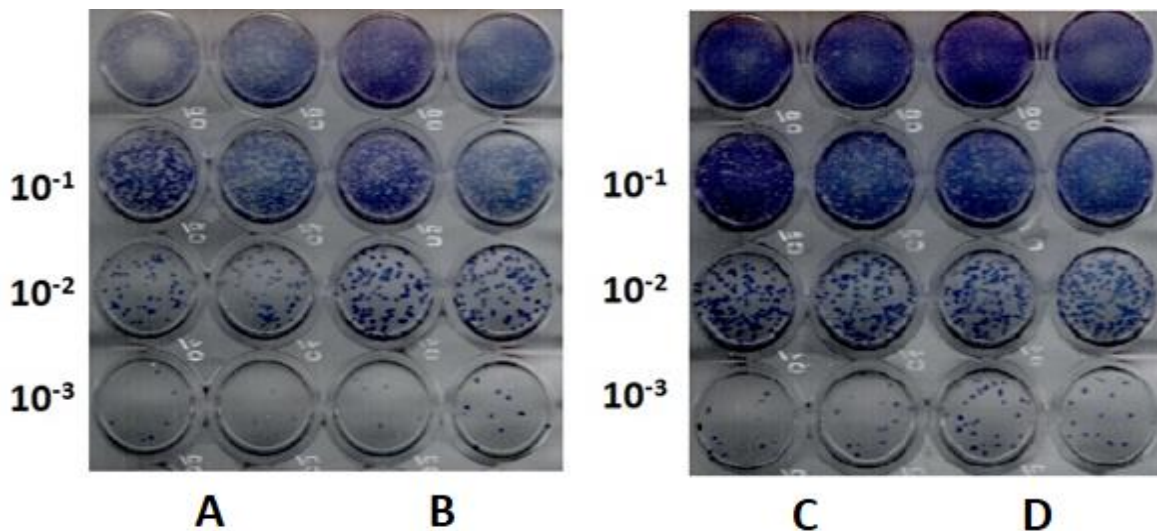


Figura 7. PFUs de aislados flavivirales Oaxaca 2019 en pase 8 a diferentes diluciones decimales seriadas. Se muestran monocapas de células Vero infectadas con las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de los aislados Oax17 (A), Oax10 (B), Oax35 (C) y Oax19 (D).

CINÉTICA DE REPLICACIÓN DE AISLADOS FLAVIVIRALES OAXACA 2019

La cinética de replicación de los cuatro aislados se obtuvo a partir de la titulación de los sobrenadantes de la infección de una monocapa de células Vero a 0.1 MOI mantenida durante 6 días. Durante esta cinética se observó que a 1 dpi los cultivos infectados con los aislados Oax10, Oax17 y Oax19 comenzaron a presentar mayor CPE que el aislado Oax35, esto reflejado en el cambio morfológico celular pues se observa mayor cantidad de cúmulos de células con morfología redondeada en los cultivos infectados con los aislados Oax10, Oax17 y

Oax19 (Figura 8A-C), mientras que con el aislado Oax35 la mayoría de las células mantiene su morfología alargada y hay menos células redondeadas (Figura 8D). A partir de los 4 dpi la mayor parte de la monocapa celular se había desprendido en todas las infecciones, dificultando identificar las diferencias en el efecto citopático entre aislados.

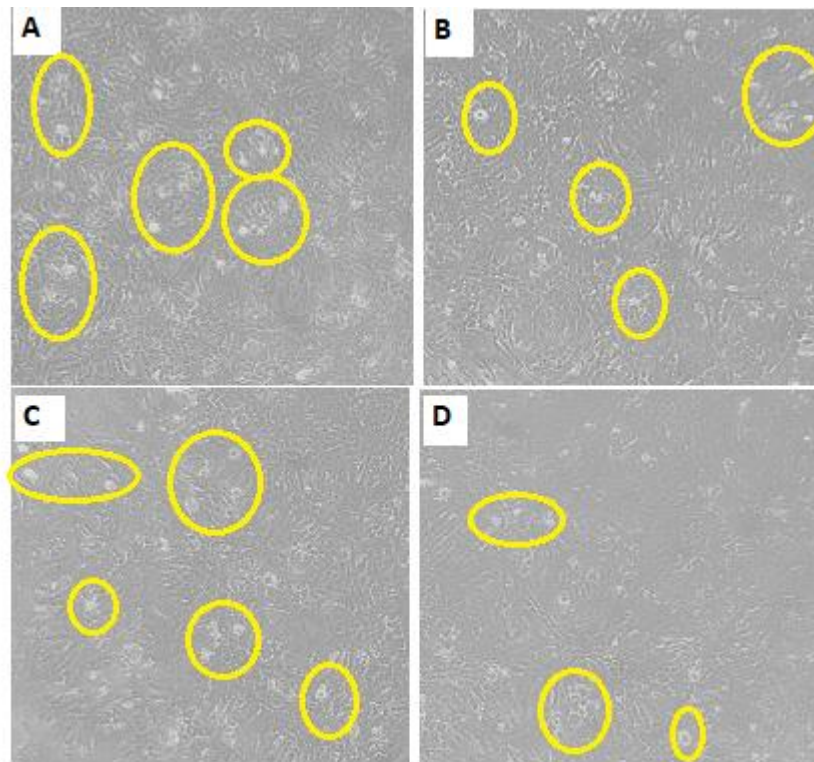


Figura 8. Efecto citopático (CPE) en células Vero infectadas con aislados flavivirales Oaxaca 2019. Se muestra el CPE (señalado en un círculo) en células Vero infectadas con los aislados Oax10 (A), Oax17 (B), Oax19 (C) y Oax35 (D) a 0.1 MOI a 1 dpi.

Los títulos virales muestran que los cuatro aislados presentan una cinética de replicación muy similar entre sí en la línea celular Vero (Figura 9). Desde el primer dpi, los aislados presentan un título viral alto entre los 5.73 log y 6.26 log, pero alcanzan su mayor título viral a los 2 dpi el cual fue de 6.80 log para Oax10, 7.10 log para Oax17, 6.90 log para Oax19 y 6.29 log para Oax35. Posterior a este día

se observa la disminución progresiva de los títulos virales de todos los aislados, sin embargo, posterior a los 4 dpi aumentan nuevamente, llegando a alcanzar casi sus títulos máximos a los 6 dpi. De todos los aislados, Oax35 presenta los títulos significativamente menores respecto a los demás aislados a los 2 dpi ($p= 0.0018$ vs Oax10, $p <0.0001$ vs Oax17, $p= 0.0002$ vs Oax19), 4 dpi ($p= 0.0025$ vs Oax10, $p <0.0001$ vs Oax17, $p <0.0001$ vs Oax19) y 5 dpi ($p <0.0001$ vs Oax10, Oax17 y Oax19) (Figura 9).

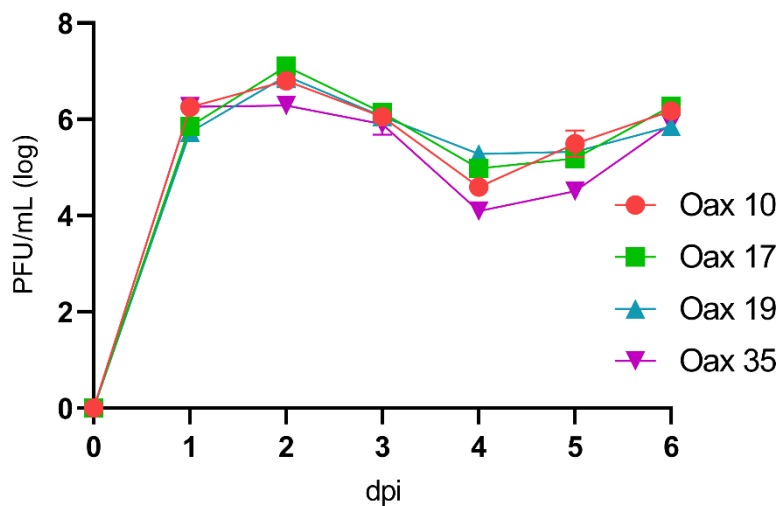


Figura 9. Cinética de replicación de la infección de células Vero con aislados Oaxaca 2019. Se muestra el título viral en PFU/mL (log) de los aislados Oax10 (rojo), Oax17 (verde), Oax19 (azul) y Oax35 (morado) en cada dpi de la infección de células Vero a 0.1 MOI durante 6 días.

FENOTIPO EVASOR DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA DEPENDIENTE DE IFNS-I DE LOS AISLADOS DE FLAVIVIRUS

Una de las propiedades del IFN- α es la actividad anti-proliferativa sobre la división celular lo cual fue evidente en todos los cultivos con tratamiento de IFN- α proporcionalmente a su concentración. Durante los seis días de la infección los cultivos con 1 UI/mL presentaron un ritmo de división celular similar al control sin IFN- α , en los primeros tres dpi predomina el sobrecrecimiento celular observado a

través de la formación de cúmulos de células con morfología alargada (Figura 10A), sin embargo, en los tratamientos con 10 y 100 IU/mL de IFN- α se presentó menor sobrecrecimiento celular (Figura 10A y C). El CPE de la infección con cada aislado también se observó proporcional a la concentración de IFN- α , este CPE está reflejado en el cambio de la morfología celular alargada a células redondeadas y desprendidas de la monocapa celular (Figura 10A y D). En los tratamientos preincubados con 100 IU/mL de IFN- α es posible observar menor CPE durante los seis días de la cinética, mientras que con 1 y 10 IU/mL de IFN- α el CPE de cada aislado es visible entre los 2 y 3 dpi a través de los mismos cambios en la morfología celular. Posteriormente el sobrecrecimiento y grado de desprendimiento de la monocapa en la infección con todos los aislados dificulta su identificación (Figura 10A).

A los 2 dpi con 1 IU/mL de IFN- α todos los aislados indujeron similar CPE en los cultivos de células Vero, con un efecto discretamente mayor inducido por el aislado Oax19 pues se muestran más células con morfología redondeada que cúmulos de células alargadas (Figura 10B). En los cultivos preincubados con 10 IU/mL de IFN- α a 2 dpi los aislados Oax17, Oax19 y Oax35 indujeron un CPE similar, en este caso Oax10 presentó el menor CPE de todos pues se observan menos células de morfología redondeada. Finalmente, en los cultivos preincubados con 100 IU/mL de IFN- α a 2 dpi el aislado Oax35 indujo el mayor CPE pues presenta discretamente mayor cantidad de células con morfología redondeada, seguido de Oax19, Oax17 y Oax10 (Figura 10C). En general, se observa que Oax10 presenta el menor CPE a 2 dpi.

A partir de los 4 dpi, en los cultivos preincubados con 1 IU/mL y 10 UI/mL de IFN- α el desprendimiento de la monocapa es similar entre aislados impidiendo diferenciar el CPE, sin embargo, en los cultivos preincubados con 100 UI/mL de IFN- α , el aislado Oax35 indujo el mayor CPE observado a través del redondeamiento y desprendimiento de la monocapa celular. Considerando este criterio, a esta concentración de IFN- α observamos que el aislado Oax10 indujo más CPE que Oax17. En los siguientes días se observa que el aislado Oax10

presenta progresivamente mayor redondeamiento y desprendimiento celular que los demás aislados, hasta que a los 6 dpi es el aislado más citopático de todos los aquí estudiados, aunque las diferencias entre aislados son sutiles. Los aislados Oax17 y Oax19 presentan un CPE similar entre sí y Oax35 fue el menos citopático al mantener ligeramente mayor área de células adheridas y con morfología alargada y menos células desprendidas de la monocapa (Figura 10D). Estos resultados muestran que existen diferencias, aunque sutiles, en la capacidad citopática entre aislados mexicanos y que el efecto antiviral del IFN- α disminuye el potencial citopático de los aislados.

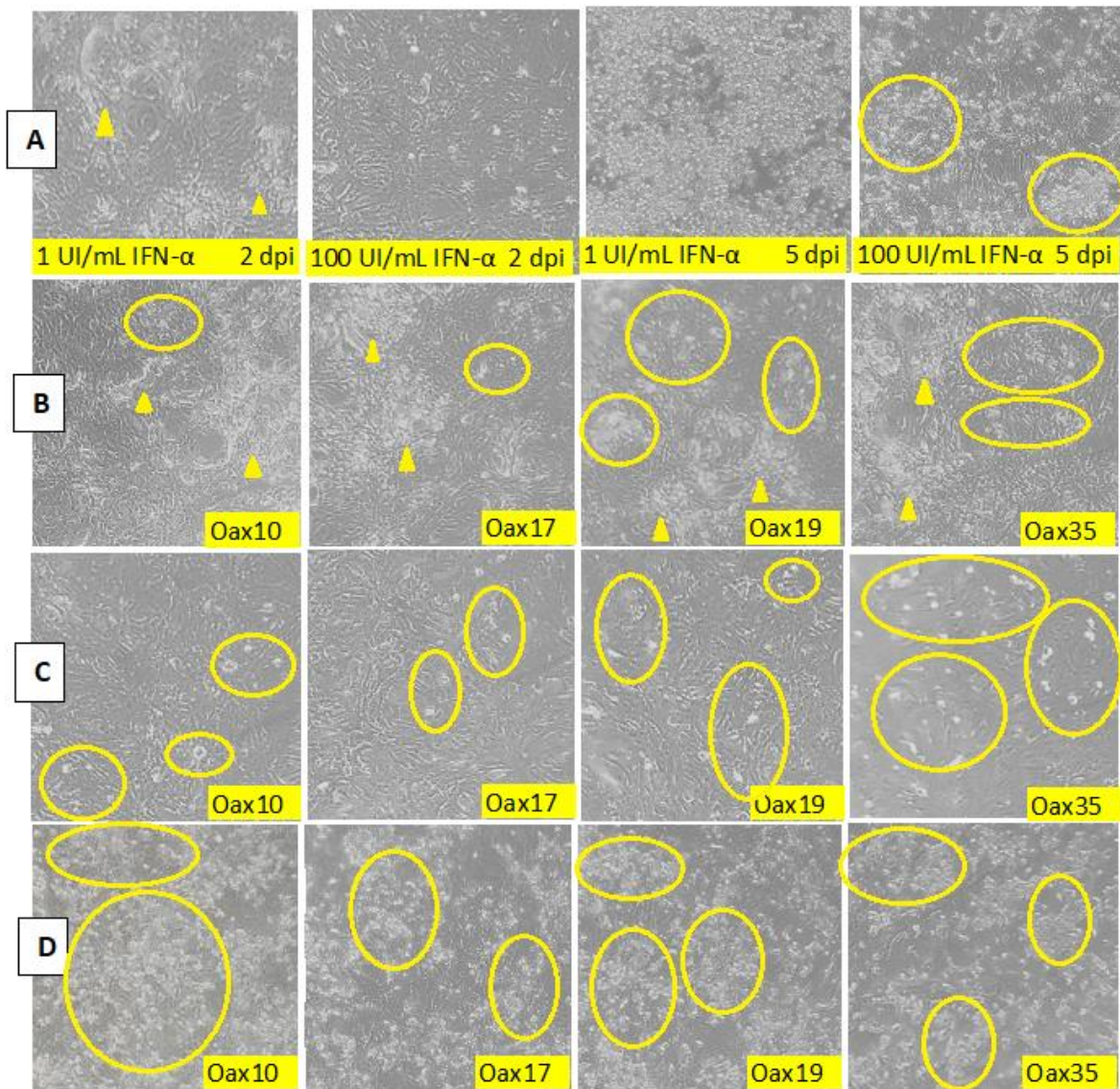


Figura 10. Efecto de la infección con los aislados de *Flavivirus* de Oaxaca en células Vero preincubadas con IFN- α . A) CPE en células Vero preincubadas con 1 y 100 IU/mL de IFN- α e infectadas con virus referencia DENV-1 Western Pacific a 2 dpi y 5 dpi. B) CPE en células Vero infectadas con los cuatro aislados Oaxaca 2019 y preincubadas con 1 IU/mL IFN- α a 2 dpi. C) Células Vero infectadas con los cuatro aislados Oaxaca 2019 a 100 IU/mL IFN- α a 2dpi. D) Células Vero infectadas con los cuatro aislados Oaxaca 2019 a 100 IU/mL IFN- α a 6 dpi. CPE encerrado en un círculo, sobrecrecimiento señalado con triángulos.

Los títulos virales obtenidos de los sobrenadantes de células Vero infectadas con cada uno de los aislados Oaxaca 2019 bajo los diferentes tratamientos con IFN- α se observan en la figura 11, donde es posible diferenciar el efecto antiviral con cada uno de los tratamientos con IFN- α . Observamos una relación inversamente proporcional entre la concentración de IFN- α y el título viral a lo largo de la cinética; los títulos a 1 IU/mL y sin IFN- α son similares en los cuatro aislados durante los seis días de infección, sin embargo, con 10 y 100 IU/mL de IFN- α se observan diferencias entre tratamientos y entre aislados.

En células pre-estimuladas con 10 IU/mL de IFN- α los títulos de los cuatro aislados son significativamente menores que los títulos en células preestimuladas con 1 IU/mL y sin IFN- α durante los primeros 2 dpi. Al tercer dpi todos los aislados alcanzan su máximo título, siendo de 6.13 log para Oax10, 6.78 log para Oax17, 6.04 log para Oax19 y 5.97 log para Oax35, es decir que el tratamiento con 10 IU/mL IFN- α retrasó la cinética de replicación un día completo en todos los aislados en comparación con la cinética con 1 IU/mL y sin IFN- α (Figura 11). A los 4, 5 y 6 dpi los aislados Oax10, Oax17 y Oax19 disminuyen sus títulos virales, pero con valores similares a los tratamientos con 1 IU/mL y sin IFN- α , sugiriendo que tienen la capacidad de superar el efecto antiviral del IFN- α .

En la cinética de infección del aislado Oax35 en células Vero preestimuladas con 10 IU/mL de IFN- α , además de retrasarse un día la cinética de replicación, los títulos correspondientes a los 4 y 5 dpi son significativamente mayores a los títulos en células preestimuladas con 1 IU/mL y sin IFN- α infectadas con este mismo

aislado ($p < 0.0001$ a 4 dpi, $p = 0.0002$ a 5 dpi) (Figura 11). Esta diferencia sugiere que el aislado Oax35 podría tener mayor capacidad de evadir la respuesta antiviral desencadenada por 10 IU/mL de IFN- α durante los 4 y 5 dpi que los aislados Oax10, Oax17 y Oax19.

En los títulos obtenidos de los sobrenadantes de células Vero preincubadas con 100 IU/mL se observan las mayores diferencias entre aislados. Bajo esta concentración, todos los aislados presentaron una cinética ascendente de sus títulos virales durante los seis días, por lo que el máximo título se presentó a los 6 dpi siendo de 6.13 para Oax10, 6.02 para Oax17, 5.73 log para Oax19 y 5.8 log para Oax35 (Figura 11). Una observación interesante es que el título máximo alcanzado en las células Vero infectadas con el aislado Oax35 preincubadas con 100 IU/mL de IFN- α es muy similar al que alcanza en la cinética basal, adicionalmente fue el aislado menos susceptible en células Vero preincubadas con 10 y 100 IU/mL IFN- α respecto a su cinética basal en los primeros tres días de la infección. En conjunto, estos resultados muestran que la actividad antiviral de 100 IU/mL IFN- α retrasa hasta 3 dpi la cinética de replicación de todos los aislados y que probablemente el aislado Oax35 sea el mejor evasor de la respuesta inmunológica innata dependiente de IFN- α en comparación con el resto de aislados.

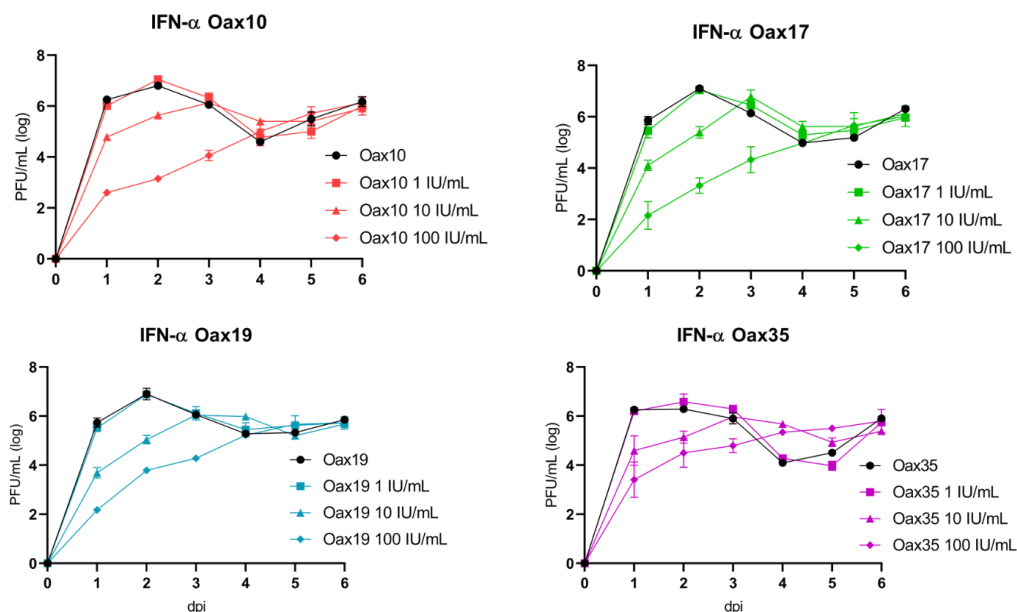


Figura 11. Cinética de replicación de aislados Oaxaca 2019 en la infección de células Vero a 0.1 MOI preestimuladas con IFN- α . Se presentan en color rojo los títulos de la infección con el aislado Oax10, en verde Oax17, en azul Oax19 y en morado Oax35. Los tratamientos con IFN- α se representan de la siguiente manera: ● sin IFN- α ; ■ 1 IU/mL de IFN- α ; ▲ 10 IU/mL de IFN- α ; ◆ 100 IU/mL de IFN- α .

Para analizar las diferencias en los títulos entre aislados virales y entre tratamientos de IFN- α , pero considerando la cinética basal de cada aislado, se calculó el porcentaje de reducción de la infección. Al analizar las diferencias en el porcentaje de reducción de la infección entre aislados en cada dpi se observó que durante el primer día todos los aislados con las tres concentraciones de IFN- α disminuyeron sus títulos virales respecto a los títulos sin IFN- α , sin embargo en los días posteriores, a 1 y 10 IU/mL comenzaron a presentar valores negativos de porcentaje de reducción de la infección, es decir, que en los tratamientos con IFN- α se presentaron títulos mayores que sin IFN- α , probablemente debido al mantenimiento de la viabilidad de las células por el tratamiento con IFN- α a diferencia del control sin IFN- α (Figura 12 superior).

A partir de los 4 dpi los tratamientos con 100 IU/mL también comenzaron a presentar valores negativos del porcentaje de reducción de la infección, sin embargo, todos vuelven a ser positivos a los 6 dpi, pero este porcentaje es menor y más homogéneo entre las diferentes concentraciones de IFN- α que en los primeros dpi (Figura 12 inferior).

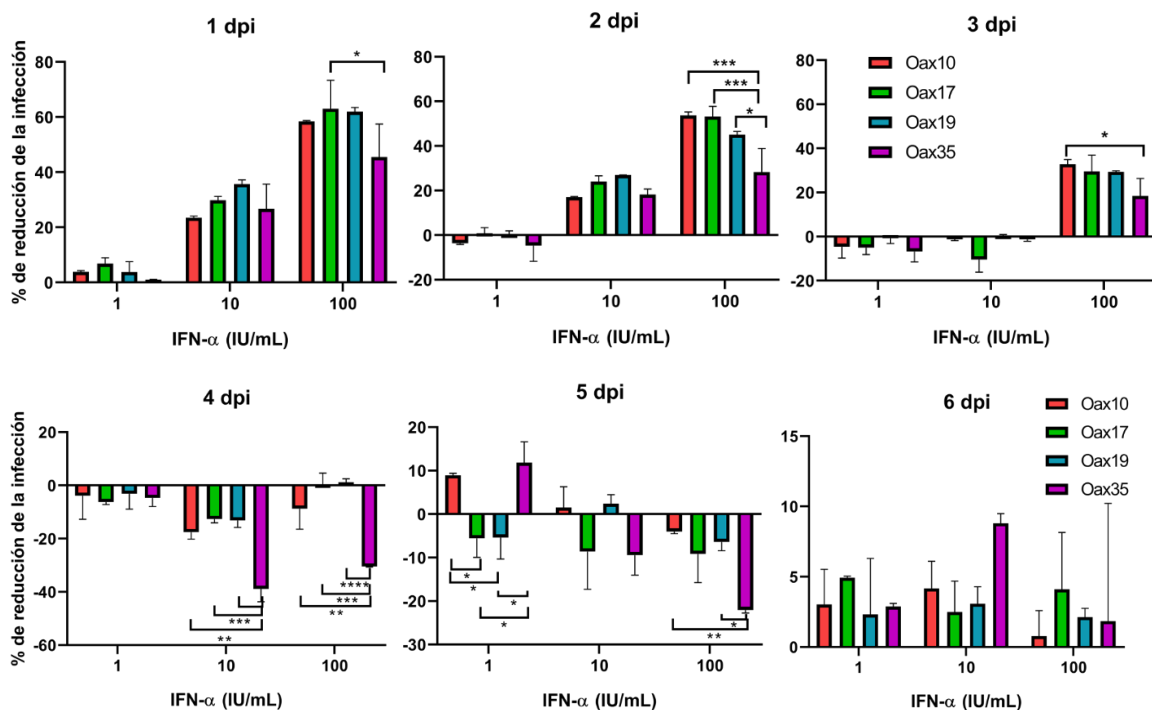


Figura 12. Porcentaje de reducción de la infección de células Vero con los aislados Oaxaca 2019 preestimuladas con IFN- α . Se muestra el porcentaje de reducción de la infección con Oax10 (rojo), Oax17 (verde), Oax19 (azul) y Oax35 (morado) a 0.1 MOI en seis diferentes días post-infección en células Vero preestimuladas con 1, 10 y 100 IU/mL IFN- α . Se marcan las diferencias significativas entre aislados bajo una misma concentración de IFN- α y mismo dpi (* $p= 0.0332$; ** $p= 0.0021$; *** $p= 0.0002$; **** $p<0.0001$).

Mediante el análisis estadístico se muestra que las diferencias significativas entre aislados se encuentran con 100 IU/mL de IFN- α durante los primeros cinco días de la infección. En esta concentración el aislado Oax35 presenta significativamente menor porcentaje de reducción de la infección que los demás aislados, confirmando su mayor capacidad de evasión de la respuesta de IFN- α . Sin embargo, en este análisis no observamos diferencias significativas entre los aislados Oax10, Oax17 y Oax19 (Figura 12).

Para identificar las posibles diferencias de evasión de la respuesta de IFN- α entre los aislados Oax10, Oax17 y Oax19 se analizaron las diferencias del porcentaje de

reducción de la infección de cada aislado entre las diferentes concentraciones de IFN- α en un mismo dpi (Figura 13).

Las mayores diferencias entre concentraciones se observaron en los primeros tres días. Las mayores diferencias se observaron entre la reducción de la infección en células preincubadas con 1 y 100 IU/mL de IFN- α en los cuatro aislados ($p < 0.0001$ a 1, 2 y 3 dpi, $p = 0.0002$ para Oax35 a los 3 dpi); sin embargo al comparar el grado de significancia entre 1 y 10 IU/mL del aislado Oax10 a 1 y 2 dpi presenta los mayores valores de P ($p = 0.0109$ en 1 dpi, $p = 0.0010$ en 2 dpi) indicando que entre ambas concentraciones hay menor reducción de la infección que la que ocurre con Oax17, Oax19 y Oax35 es decir, podría ser un mejor evasor que estos tres aislados a los 1 y 2 dpi, sin embargo a 3 dpi el fenotipo evasor es igual entre ellos ya que ninguno presenta diferencias significativas (Figura 13).

Al comparar los valores de reducción de la infección en células preincubadas con las concentraciones 10 y 100 IU/mL de IFN- α se observa que en los tres días Oax35 presenta las mayores valores de P ($p = 0.0144$ a 1 dpi, $p = 0.1004$ a 2 dpi, $p = 0.0018$ a 3 dpi), seguido de Oax19 ($p = 0.0013$ a 1 dpi; $p = 0.0029$ a 2 dpi, $p < 0.0001$ a 3 dpi), y finalmente Oax10 y Oax17 presentaron los menores valores de P ($p = 0.0001$ para Oax10 y $p = 0.0002$ para Oax17 a 1 dpi; $p < 0.0001$ para Oax10 y Oax17 a 2 y 3 dpi) por lo que el mejor evasor de la respuesta de IFN- α a esta concentración es Oax35, seguido de Oax19, y los peores evasores son Oax17 y Oax10 (Figura 13).

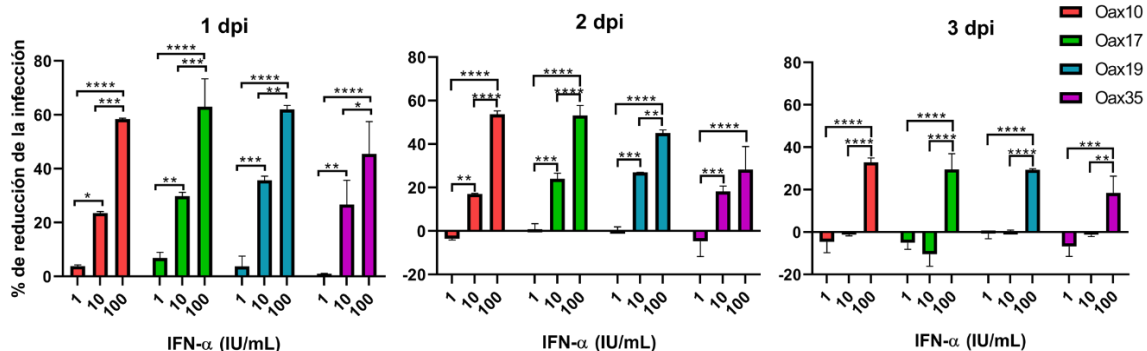


Figura 13. Porcentaje de reducción de la infección de células Vero con los aislados Oaxaca 2019 preestimuladas con IFN- α . Se muestra el porcentaje de reducción de la infección con Oax10 (rojo), Oax17 (verde), Oax19 (azul) y Oax35 (morado) a 0.1 MOI en tres diferentes días post-infección en células Vero preestimuladas con 1, 10 y 100 IU/mL IFN- α . Se marcan las diferencias significativas entre concentraciones de IFN- α de un mismo aislado y mismo dpi (* $p= 0.0332$; ** $p= 0.0021$; *** $p= 0.0002$; **** $p<0.0001$).

CINÉTICA DE INFECCIÓN DE LOS AISLADOS DE *FLAVIVIRUS* EN DISTINTOS MODELOS CELULARES

El fenotipo evasor de la respuesta antiviral dependiente de IFN- α de los aislados de *Flavivirus* observado en el modelo con células Vero se validó mediante la infección de la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos (HFF-1), caracterizados por su capacidad de producción de IFNs-I (Kurane et al., 1992). Se mantuvo la infección de un millón de células HFF-1 a 0.1 MOI durante 4 días y se recuperó una muestra del sobrenadante de cada día post infección el cual se tituló mediante inmunocitoquímica

La figura 14 muestra las cinéticas de replicación en fibroblastos en donde se observa que todos los aislados presentan una cinética creciente con sus máximos títulos virales a los 4 dpi, siendo de 4.34 log para Oax35, 4.13 log para Oax19, 3.71 log para Oax17 y 3.31 log para Oax10 (Figura 14) donde el título de Oax35 es significativamente mayor que el de Oax10 ($p=0.0087$ a 4 dpi). Estos títulos muestran que el aislado Oax35 produce significativamente mayor cantidad de partículas virales infecciosas que el aislado Oax10 durante los 2, 3 y 4 dpi de la cinética, posiblemente reflejo de su capacidad evasora de los IFNs. Así como se observó en el modelo con IFN- α en células Vero, en HFF-1 Oax19 presentó menores títulos que Oax35, pero mayores a los de Oax17 y Oax10 en concordancia con el fenotipo evasor definido a partir de este modelo.

Comparando la cinética de los cuatro aislados en HFF-1 y en Vero con 100 IU/mL de IFN- α , se observa un comportamiento creciente en ambas líneas celulares, pero con títulos máximos mayores en el modelo de células Vero donde son claros los mayores títulos del aislado Oax35 y, aunque fluctúan los de los demás aislados, se asemejan al fenotipo evasor observado en HFF-1 (Figura 14). La mayor capacidad de producción de partículas virales infecciosas en células epiteliales como los fibroblastos son de importancia para el establecimiento de la infección productiva en el hospedero, ya que, al ser un sitio primario de replicación, la capacidad del virus de infectar y replicar en la piel, puede determinar su probabilidad de diseminación a partir de la carga viral producida en estos sitios.

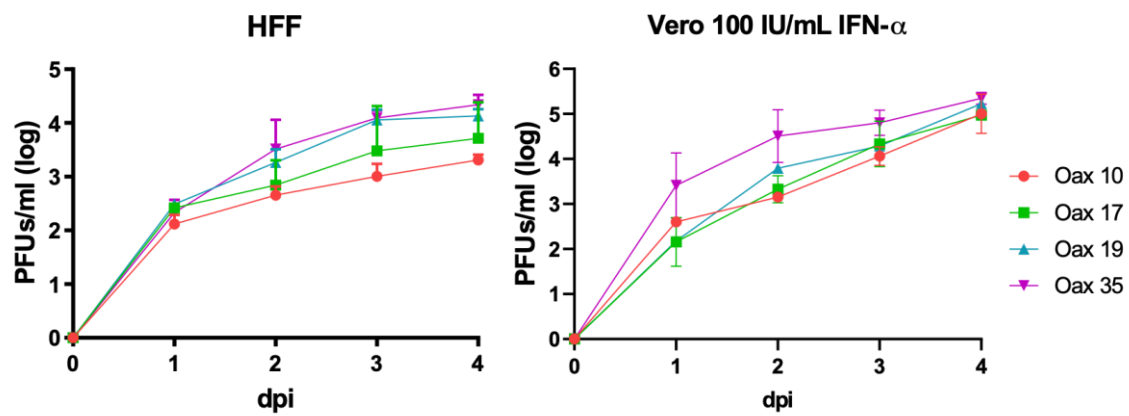


Figura 14. Cinéticas de replicación de aislados Oaxaca 2019 en una línea celular de fibroblastos dérmicos (HFF-1) y células Vero. Se muestra el título viral en PFU/mL (log) de los aislados Oax10 (rojo), Oax17 (verde), Oax19 (azul) y Oax35 (morado) en cada dpi de la infección de células HFF-1 (izquierda) y Vero preestimuladas con 100 IU/mL de IFN- α (derecha) a 0.1 MOI durante 4 días.

Al infectar monocitos de la línea celular U937 con los mismos aislados y en las mismas condiciones los títulos máximos ocurren a los 2 dpi para Oax10 (4 log), Oax17 (3.65 log) y Oax19 (3 log), y a 1 dpi para Oax35 (3.2 log) donde el máximo

título del aislado Oax10 fue significativamente mayor que el máximo título de Oax19 ($p= 0.0102$) y el máximo título de Oax35 ($p= 0.0419$). En esta línea celular a partir de los 2 dpi Oax10 presentó significativamente los mayores títulos virales respecto a los demás aislados, seguido de Oax17 y finalmente Oax19 y Oax35 (Figura 15), en orden contrario a las cinéticas en HFF-1 (Figura 14). También, las diferencias de los títulos entre todos los aislados son más significativas que las diferencias observadas en HFF-1. El comportamiento de la cinética que siguen los aislados en U937 se asemeja a la que presentan en células Vero con 1 IU/mL IFN- α donde también ocurren los máximos títulos a los 2 dpi y a partir de ahí comienzan a decrecer, sin embargo, en células Vero con 1 IU/mL IFN- α sólo se observan diferencias significativas a los 1 y 4 dpi: a 1 dpi el título del aislado Oax35 es significativamente mayor al de los aislados Oax17 ($p= 0.0034$) y Oax19 ($p= 0.0077$), pero a los 4 dpi cambia a ser significativamente menor al título de estos aislados ($p < 0.0001$ para Oax17 y Oax19) (Figura 15).

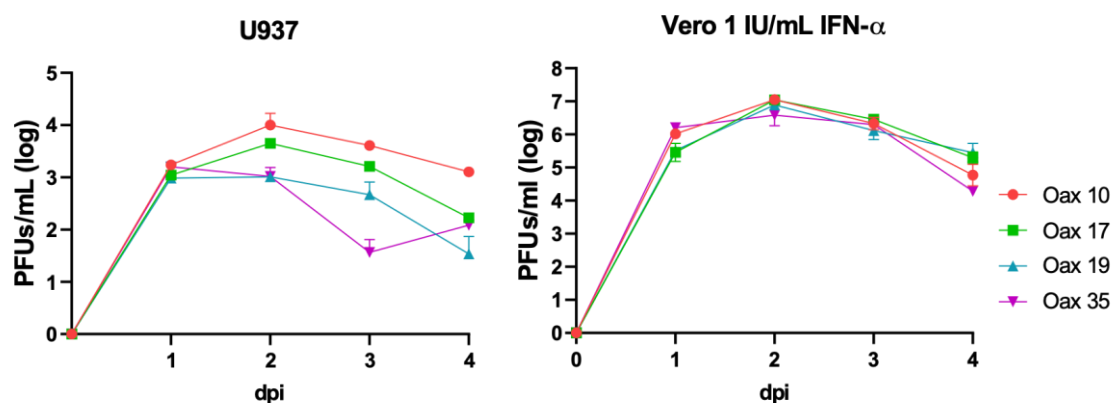


Figura 15. Cinéticas de replicación de aislados Oaxaca 2019 en una línea celular de monocitos (U937) y células Vero. Se muestra el título viral en PFU/mL (log) de los aislados Oax10 (rojo), Oax17 (verde), Oax19 (azul) y Oax35 (morado) en cada dpi de la infección de células U937 (izquierda) y Vero preestimuladas con 1 IU/mL de IFN- α (derecha) a 0.1 MOI durante 4 días.

DISCUSIÓN

A través de la cinética de replicación de los cuatro aislados Oaxaca 2019 en células Vero, se observa que todos presentaron una capacidad similar para la formación de nuevas partículas virales infecciosas (Figura 9). En estas células, el aislado Oax35 indujo el menor CPE a los 2 dpi (Figura 8D).

Cuando las células Vero fueron preestimuladas con diferentes concentraciones de IFN- α se observaron diferencias discretas en el CPE entre los cuatro aislados de *Flavivirus* (Figura 10), pero diferencias significativas en la capacidad de formación de nuevas partículas infecciosas. De acuerdo con la cinética de replicación, bajo los tratamientos con IFN- α observamos que el mayor efecto sobre los títulos virales ocurre en los primeros tres días de la cinética replicativa, evidenciado en las mayores diferencias en el porcentaje de reducción de la infección entre aislados (Figura 11 y 12). Esto concuerda con la relevancia de la actividad de los IFNs-I los cuales son de las primeras respuestas antivirales que se activan para controlar la infección, Bustos-Arriaga y colaboradores describieron que la respuesta de los IFNs-I puede mantenerse fuertemente activa desde las 6 horas posteriores a la infección (hpi) por DENV, iniciando con el aumento de la expresión del receptor TLR3, y mantener una alta expresión de RIG-I hasta 36 hpi. La expresión de IFN- β aumenta significativamente entre las 6-12 hpi y comienzan a disminuir a las 24 hpi, momento en el cual la expresión de TNF- α es significativamente mayor y se mantiene hasta las 36 hpi. A su vez, la expresión de defensina H β D2 (un péptido antimicrobiano con actividad antiviral) ocurre desde las 12 hpi (Bustos-Arriaga et al., 2011).

Se ha evidenciado que durante la etapa crítica de la enfermedad del dengue se llegan a cuantificar entre 10 y 100 IU/ml de IFN- α en el suero de pacientes, por lo que las concentraciones de IFN- α utilizadas en nuestro modelo se ajustan a las concentraciones fisiológicas (De La Cruz Hernández et al., 2014a; Talarico et al., 2017).

El análisis de los primeros tres días de la infección de células Vero preestimuladas con IFN- α evidenció al aislado Oax35 como el mejor evasor de la respuesta antiviral desencadenada por el IFN- α , aunque diferencias menos estadísticamente significativas entre los aislados Oax19, Oax17 y Oax10 (Figura 12). Estos resultados muestran que entre la población mexicana co-circulan variantes de DENV con capacidad variable de evasión de la respuesta de IFNs-I que podría influenciar la capacidad adaptativa o *fitness*, esto evidenciado por los aislados del mismo brote epidémico de Oaxaca en 2019.

Los resultados del modelo con células Vero estimuladas con IFN- α recombinante nos permitió caracterizar la resistencia de los aislados Oaxaca 2019 a la actividad antiviral de los ISGs expresados por la inducción del IFN- α exógeno. Esto debido a que la línea celular Vero mantiene intacto y funcional su receptor IFNAR y la vía JAK-STAT que le permiten producir ISGs en respuesta a la estimulación con IFNs-I, a pesar de no expresar IFNs endógenos (Naoki et al., 2014). Sin embargo, desconocemos la capacidad de replicación de estos aislados incluyendo la vía inductora de la expresión de los IFNs-I por lo que se infectaron células competentes en la producción de IFNs-I endógenos y que su participación durante los primeros días de la infección fuera relevante.

La piel es el primer tejido expuesto a la inoculación del DENV durante la picadura del mosquito y, por lo tanto, donde ocurren los primeros ciclos de replicación del virus y las primeras respuestas antivirales. En la dermis son abundantes los fibroblastos, células residentes no hematopoyéticas cuya producción de IFN- β , TNF y β -defensinas ante la infección con DENV es esencial para contener la infección (Bustos-Arriaga et al., 2011), además de activar y modular la respuesta inmunológica adaptativa (Rathore & St John, 2018). Los resultados de la cinética de replicación del aislado Oax35 en la línea celular HFF-1 (Figura 14) sugieren que este aislado podría tener la mayor capacidad de evadir la producción de IFNs-I, así como la mayor capacidad de evasión de la expresión de ISGs o a su actividad antiviral. Estas características podrían favorecer su producción de partículas virales infecciosas en la dermis, aumentando su probabilidad de

establecer la infección. En caso contrario, de acuerdo con la cinética de replicación del aislado Oax10 en células HFF-I (Figura 14), este aislado podría presentar peor evasión de la producción de IFNs-I y mayor sensibilidad a la actividad antiviral de los ISGs que podría resultar en una menor producción de partículas virales que puedan establecer la infección.

Las diferentes capacidades de evasión de los IFNs-I podrían ser favorecidas por los diferentes mecanismos que llevan a cabo los aislados para irrumpir esta vía, ya sea en la vía inductora de la expresión de IFNs o en la vía de la actividad antiviral de los IFNs-I (expresión y actividad de los ISGs). En el análisis realizado por Castro-Jiménez y colaboradores en 2022 se muestra que entre estos aislados Oaxaca 2019 no hay diferencias significativas entre su acumulación de sfRNA (Castro-Jiménez et al., 2022), por lo que las diferencias en su capacidad de evasión de los IFNs-I podría ser través de otro mecanismo como la inhibición de la unión de RIG-I a MAVS (Chan & Gack, 2016; He et al., 2016), la inhibición de la fosforilación de TBK1 (Dalrymple et al., 2015), la disminución de la fosforilación de STAT1 (Munoz-Jordan et al., 2003) o de la disminución de los niveles de STAT2 (Ashour et al., 2009).

La infección de las células residentes de la piel, como los mastocitos, células de Langerhans y macrófagos ocasiona su secreción de quimiocinas y mediadores inmunológicos que atraen otras células inmunológicas al sitio de inoculación como monocitos, macrófagos, células *natural killer* (NK), neutrófilos y células dendríticas (DCs) (King et al., 2020). Los monocitos y mastocitos contribuyen de manera importante en la patogénesis del DENV al considerarse de las células con mayor replicación viral en circulación y por su alta producción de citocinas proinflamatorias y mediadores inmunológicos en respuesta a la infección como TNF, IL-1 β , IL-6, CXCL8, VEGF, PAF, MIF, CCL2, HMGB-1 y metaloproteasas de matriz, generando una tormenta de citocinas común en el DCSA y DG. Se ha propuesto que esta respuesta inflamatoria contra DENV podría activar el endotelio y contribuir a la permeabilidad vascular, y por lo tanto, ser un factor activador de hemorragia y perfusión plasmática (Wan et al., 2018; Schmid & Harris, 2014). La

capacidad de replicación del aislado Oax10 en las células U937 (Figura 15) sugiere que podría ser buen evasor de la producción de IFNs-I en monocitos, permitiéndole replicar eficazmente y favoreciendo la activación de la respuesta inflamatoria de estas células. Por el contrario, el aislado Oax35, al replicar menos eficazmente en monocitos y producir menos partículas infecciosas podría activar menos la respuesta inflamatoria. (King et al., 2020). Una limitante del modelo de la línea celular U937 utilizado en este trabajo, es que no expresa naturalmente los receptores de DENV, pero tienen inducida la expresión de DC-SIGN para permitir su infección, por lo que podrían no ser un reflejo de la infección natural en el hospedero.

Las diferencias en la capacidad de producción de partículas virales por los aislados Oaxaca 2019 en células HFF-1 y U937 podrían ser consecuencia de su expresión diferencial de IFNs-I y citocinas en respuesta a la infección. Las células de origen hematopoyético (como U937) expresan IRF-7 e IRF-3 que inducen en mayor medida la expresión de IFN- α , mientras que las no hematopoyéticas (como HFF-1) expresan principalmente IRF-3 que induce la expresión de IFN- β (Honda et al., 2005). La estimulación del IFN- α o IFN- β podría activar la expresión de diferentes ISGs que podrían inhibir con mayor o menor eficiencia el ciclo replicativo del virus en cada tipo celular (Piehler et al., 2012). De esta forma la sensibilidad del virus a los IFNs-I y la secreción de mediadores inmunológicos de cada tipo celular que infectan durante la infección con DENV, podrían contribuir a contener o diseminar la infección con posibles efectos en la severidad de enfermedad.

Nuestros resultados de la sensibilidad de los aislados Oaxaca 2019 y su capacidad de replicación en HFF-1 y U937 nos permitieron proponer una posible correlación inversamente proporcional con la clasificación clínica de la enfermedad que cursaron los pacientes de los que fueron aislados. El aislado Oax10, por ejemplo, produjo la menor cantidad de partículas virales en HFF-1, sin embargo, mejoró su capacidad de replicación en células U937 sugiriendo que, a pesar de su limitada propagación en piel en el inicio de la infección, su capacidad de activar

constantemente la respuesta inflamatoria de los monocitos durante su infección podría parcialmente contribuir a una presentación clínica severa como el DCSA presentado por el paciente del que fue aislado (Tabla 2).

El fenotipo evasor que presenta el aislado Oax35 en HFF-1 pudo haber favorecido el establecimiento de su infección con una importante producción de partículas infecciosas en el epitelio, escapando más eficientemente de esta primer barrera inmunológica, sin embargo, su limitada capacidad de replicación en U937 podría limitar la activación de la respuesta inflamatoria derivando en la presentación clínica poco severa (DNG) presentada por el paciente (Tabla 2).

Recientemente, Montes-Gómez y colaboradores propusieron la contribución de los mediadores inmunológicos producidos por fibroblastos dérmicos y moDCs al microambiente del sitio de infección de DENV-2. Identificaron que las moDCs contribuyen al control de la infección de fibroblastos promoviendo su producción de IFN- β , a la par que los fibroblastos inducen la maduración de las moDCs y las vuelven más resistentes a la infección con DENV-2, además sugieren que esta interacción podría moldear la calidad de activación y proliferación de células T, alterando su respuesta contra la infección sistémica (Montes-Gómez et al., 2020).

Nuestros resultados sugieren que la capacidad de replicación de los aislados de *Flavivirus* podría estar relacionada con la severidad de la enfermedad, sin embargo, es sabido que el amplio espectro de manifestaciones clínicas presentada en la enfermedad por *Flavivirus* es influenciada por múltiples factores virales y del hospedero, tales como la activación de la respuesta inmunológica, el tiempo y carga de viremia, los niveles de NS1 en circulación, edad del paciente, e incluso el genotipo y serotipo de la infección son los que contribuyen al desarrollo de la infección (Pozo-Aguilar et al., 2014).

Se ha sugerido que los serotipos de DENV-1 y DENV-4 cuentan con mayor capacidad replicativa que los serotipos DENV-2 y DENV-3, sin embargo, características como la infectividad, citopatogenicidad y la patogenicidad son características fenotípicas seleccionadas genéticamente y probablemente no dependen del serotipo (Gutiérrez-Barbosa et al., 2020). Adicionalmente, diversos

estudios han buscado identificar los serotipos asociados a una mayor patogenicidad, encontrando resultados contrastantes; en países de Sudamérica se han identificado con mayor frecuencia infecciones con DENV-2 y DENV-3 asociadas a presentaciones clínicas severas del dengue, así como mayor frecuencia de DENV-2 en infecciones secundarias (Soo et al., 2016). La infección secundaria con un serotipo heterólogo de DENV es un factor importante para la severidad de la enfermedad, por lo que uno de los criterios de inclusión en nuestro estudio consideró la presencia de IgM, la cual es detectable principalmente en infecciones primarias (Tabla 1). Por lo que consideramos que el aporte del hospedero en la patogenicidad observada en los aislados es mínima y principalmente atribuible al fenotipo del aislado.

Respecto a las características del hospedero, Bustos-Arriaga y colaboradores describieron que cultivos primarios de fibroblastos provenientes de ex-plantas de donadores mexicanos sanos expresan diferentes niveles de IFN- β a pesar de presentar la misma susceptibilidad a la infección con DENV-2 (Bustos-Arriaga et al., 2011), esto sugiere que existen diferencias en las respuestas innatas entre hospederos con posibles efectos sobre el curso de la infección sistémica de DENV.

Para proyectar el tipo de análisis realizado en este proyecto cabe resaltar que dentro del dengue grave pueden diferenciarse subcategorías como perfusión vascular severa, hemorragia severa y/o falla multiorgánica severa, dependiendo de los signos en el paciente pues no siempre se manifiestan todas las formas graves de la enfermedad (Pozo-Aguilar et al., 2014). En este sentido, la selección de variantes virales podrían causar distintas manifestaciones clínicas en función de los factores virales, respuestas inmunológicas y características del hospedero mencionados anteriormente; esto podría ser el caso para los aislados Oax10 y Oax19 ya que, aunque ambos fueron clasificados dentro del grupo DCSA, ocasionan signos clínicos distintos (hematocrito alto y trombocitopenia, respectivamente), y el aislado Oax19 presentó mejor fenotipo evasor de IFN- α en comparación con Oax10 (Tabla 2). Hay que considerar que los datos de biometría

hemática de los pacientes utilizados para este análisis corresponden a la etapa febril-crítica de la enfermedad, en donde se presentan los primeros indicadores de la posible severidad de la enfermedad, sin embargo, se desconoce si la enfermedad progresa a formas más severas en etapas posteriores. Por lo tanto, se desconoce si la correlación observada entre el fenotipo de estos aislados y la presentación clínica concuerde con la progresión de la enfermedad. De igual manera se requiere de la inclusión de mayor número de muestras y con presentaciones clínicas de dengue grave para ampliar el análisis y aumentar el poder estadístico de estos resultados.

Las diferencias en los primeros días de la cinética de replicación entre los aislados Oaxaca 2019 observadas en este trabajo, reflejan que este tipo de análisis podría ser una herramienta para estudiar los elementos celulares y virales asociados a la patogénesis de la infección con *Flavivirus* durante la etapa febril-crítica. Más estudios comparativos entre la susceptibilidad de infección por *Flavivirus* entre células hematopoyéticas y no hematopoyéticas podrían elucidar elementos clave de la patogénesis de *Flavivirus*.

CONCLUSIONES

Se logró la amplificación viral de cuatro aislados de *Flavivirus* a partir de muestras serológicas de pacientes con diagnóstico clínico y serológico de dengue durante la etapa febril, en los cuales se identificaron diferencias en la capacidad citopática, sensibilidad a la respuesta antiviral desencadenada por IFN-I, y producción de partículas virales en células HFF-1 y U937 sugiriendo la selección de variantes virales a pesar de provenir de una misma área geográfica y brote. Estas características podrían estar relacionadas con su patogenicidad y su capacidad de transmisión.

El aislado Oax35 presentó la mayor capacidad evasora de IFN-I que podría favorecer su capacidad de replicación en células HFF-1, sin embargo, la producción de partículas infecciosas es menos exitosa en células U937, esto podría activar menos constantemente su respuesta inflamatoria, explicando parcialmente la severidad de la enfermedad que desencadena, como se identificó en su clasificación clínica (DNG). Mientras que para un aislado con menor evasión de IFN-I, como Oax10, se observó menor capacidad de replicación en células HFF-1, pero mayor en U937 y con una clasificación clínica grave (DCSA).

Por lo tanto, la severidad de la enfermedad podría estar asociada a variaciones en el tropismo celular de las variantes virales seleccionadas durante los ciclos de transmisión. Este tropismo podría estar favorecido por la capacidad de evasión del virus a la respuesta antiviral desencadenada por los IFNs-I durante la etapa febril de la enfermedad.

PERSPECTIVAS

1. Caracterizar la especie de *Flavivirus* a la que corresponden los aislados Oaxaca 2019.
2. Cuantificar y comparar la expresión de IFN- α/β en células infectadas con los aislados Oaxaca 2019 para demostrar la irrupción de la vía de señalización inductora de la expresión de IFNs-I.
3. Caracterizar y cuantificar la expresión de citocinas pro-inflamatorias en células U937 infectadas con los aislados Oaxaca 2019.
4. Caracterizar los mecanismos de evasión que llevan a cabo los aislados Oaxaca 2019 para irrumpir la vía de señalización de los IFNs-I.
5. Aumentar el número de aislados y su información clínica para el análisis de su susceptibilidad a IFNs-I y su correlación con la severidad de la presentación clínica
6. Comparar la sensibilidad a IFNs-I de aislados de diferentes áreas geográficas, años epidémicos y con diversidad de presentaciones clínicas.
7. Caracterizar el fenotipo evasor de aislados mexicanos de *Flavivirus* en cultivos primarios de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas implicadas durante la infección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Ordoñez, I., Pérez-Villatoro, F., García-Ortiz, H., Barajas-Olmos, F., Ballesteros-Villascán, J., González-Buenfil, R., Fresno, C., Garcíarrubio, A., Fernández-López, J. C., Tovar, H., Hernández-Lemus, E., Orozco, L., Soberón, X., & Morett, E. (2021). Whole genome variation in 27 Mexican indigenous populations, demographic and biomedical insights. *PLOS ONE*, *16*(4), e0249773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249773>
- Alboudi, A., & Jameson, A. (2021). Clinical manifestations and outcomes of Guillain-Barre syndrome complicating Zika virus infection. In *Zika Virus Impact, Diagnosis, Control, and Models* (pp. 201–205). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820267-8.00019-4>
- Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P.-Y., & García-Sastre, A. (2009). NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. *Journal of Virology*, *83*(11), 5408–5418. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-08>
- Barnard, T. R., Abram, Q. H., Lin, Q. F., Wang, A. B., & Sagan, S. M. (2021). Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. *Trends in Biochemical Sciences*, *46*(5), 378–390. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2020.12.007>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, *118*(8), 4448. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00719>
- Bidet, K., Dadlani, D., & Garcia-Blanco, M. A. (2014). G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 Are Required for Translation of Interferon Stimulated mRNAs and Are Targeted by a Dengue Virus Non-coding RNA. *PLOS Pathogens*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004242>
- Bigham, A. W., Buckingham, K. J., Husain, S., Emond, M. J., Bofferding, K. M., Gildersleeve, H., Rutherford, A., Astakhova, N. M., Perelygin, A. A., Busch, M. P., Murray, K. O., Sejvar, J. J., Green, S., Kriesel, J., Brinton, M. A., & Bamshad, M. (2011). Host Genetic Risk Factors for West Nile Virus Infection and Disease Progression. *PLOS ONE*, *6*(9), e24745. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0024745>
- Bustos-Arriaga, J., García-Machorro, J., León-Juárez, M., García-Cordero, J., Santos-Argumedo, L., Flores-Romo, L., Méndez-Cruz, A. R., Juárez-Delgado, F. J., & Cedillo-Barrón, L. (2011). Activation of the Innate Immune Response against DENV in Normal Non-Transformed Human Fibroblasts. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *5*(12), e1420. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001420>
- Bustos-Arriaga, J., Mita-Mendoza, N. K. N. K., Lopez-Gonzalez, M., García-Cordero, J., Juárez-Delgado, F. J. F. J., Gromowski, G. D. G. D., Méndez-Cruz, R. A. R. A., Fairhurst, R. M. R. M., Whitehead, S. S. S. S., Cedillo-

- Barrón, L., J., B.-A., N.K., M.-M., M., L.-G., J., G.-C., F.J., J.-D., G.D., G., R.A., M.-C., R.M., F., S.S., W., ... S.S., W. (2016). 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. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8675-8>
- Byk, L. A., Iglesias, N. G., De Maio, F. A., Gebhard, L. G., Rossi, M., & Gamarnik, A. V. (2016). Dengue virus genome uncoating requires ubiquitination. *MBio*, *7*(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00804-16/ASSET/95C6E75B-B2AB-4517-8BB0-34CF032E13C3/ASSETS/GRAPHIC/MBO0031628740005.JPEG>
- Castro, C., Arnold, J. J., & Cameron, C. E. (2005). Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Research*, *107*, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.004>
- Castro-Jiménez, T. K., Gómez-Legorreta, L. C., López-Campa, L. A., Martínez-Torres, V., Alvarado-Silva, M., Posadas-Mondragón, A., Díaz-Lima, N., Angulo-Mendez, H. A., Mejía-Domínguez, N. R., Vaca-Paniagua, F., Ávila-Moreno, F., García-Cordero, J., Cedillo-Barrón, L., Aguilar-Ruíz, S. R., & Bustos-Arriaga, J. (2022). Variability in Susceptibility to Type I Interferon Response and Subgenomic RNA Accumulation Between Clinical Isolates of Dengue and Zika Virus From Oaxaca Mexico Correlate With Replication Efficiency in Human Cells and Disease Severity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *0*, 649. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.890750>
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 155–170. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUU004>
- De La Cruz Hernández, S. I., Puerta-Guardo, H., Flores-Aguilar, H., González-Mateos, S., López-Martínez, I., Ortiz-Navarrete, V., Ludert, J. E., & Del Angel, R. M. (2014a). A strong interferon response correlates with a milder dengue clinical condition. *Journal of Clinical Virology*, *60*(3), 196–199. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.002>
- Dey, D., Poudyal, S., Rehman, A., & Hasan, S. S. (2021). Structural and biochemical insights into flavivirus proteins. *Virus Research*, *296*, 198343. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198343>
- Dirección de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmisibles. (2021a). *Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por Virus del Zika por Entidad Federativa SEMANA EPIDEMIOLOGICA 52, 2021*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/691598/CuadroCasosZikayE_mbosem52_2021.pdf
- Dirección de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmisibles. (2021b). *Panorama epidemiológico de dengue. Semana epidemiológica 52 de 2021*.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/690879/Pano_dengue_52_2021.pdf

- Dirección General de Epidemiología (DGE). (2019). *Panorama Epidemiológico de Dengue, 2019. Semana epidemiológica 52*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/524262/Pano_dengue_52_2019.pdf
- Fajardo-Dolci, G., Meljem-Moctezuma, J., Vicente-González, E., Vicente Venegas-Páez, F., Mazón-González, B., & Gerardo Aguirre-Gas, H. (2012). El dengue en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, *50*(6), 631–639.
- García-Blanco, M. A., Vasudevan, S. G., Bradrick, S. S., & Nicchitta, C. (2016). Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Research*, *134*, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.010>
- Gebhard, L. G., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2011). Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*, *3*(9), 1739–1756. <https://doi.org/10.3390/v3091739>
- Göertz, G. P., Abbo, S. R., Fros, J. J., & Pijlman, G. P. (2018). Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Research*, *254*, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015>
- Gutiérrez-Barbosa, H., Castañeda, N. Y., & Castellanos, J. E. (2020). Differential replicative fitness of the four dengue virus serotypes circulating in Colombia in human liver Huh7 cells. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *24*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/J.BJID.2019.11.003>
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *81*(1). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-16>
- Hernández-García, E., Muñoz, M. de L., David, R. E., Pérez-Ramírez, G., Navarrete-Espinosa, J., Díaz-Badillo, Á., Domínguez-de-la-Cruz, E., Moreno-Galeana, M., & Brito-Carreón, C. A. (2020). Epidemiological implications of the genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *84*. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104391>
- Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2005). Regulation of the type I IFN induction: a current view. *International Immunology*, *17*(11), 1367–1378. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXH318>

- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(1), 36. <https://doi.org/10.1038/NRI3581>
- Kim, J. A., Seong, R. K., Son, S. W., & Shin, O. S. (2019). Insights into ZIKV-Mediated Innate Immune Responses in Human Dermal Fibroblasts and Epidermal Keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, *139*(2), 391–399. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2018.07.038>
- King, C. A., Wegman, A. D., & Endy, T. P. (2020). Mobilization and Activation of the Innate Immune Response to Dengue Virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.574417>
- Kurane, I., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Meager, A., & Ennis, F. A. (1993). High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *48*(2), 222–229. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1993.48.222>
- Kurane, I., Janus, J., & Ennis, F. A. (1992). Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. *Archives of Virology*, *124*(1–2), 21–30. <https://doi.org/10.1007/BF01314622>
- Kurosu, T. (2011). Quasispecies of dengue virus. In *Tropical Medicine and Health* (Vol. 39, Issue 4 SUPPL., pp. 29–36). Trop Med Health. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S02>
- Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. In *PLoS Pathogens* (Vol. 6, Issue 7, pp. 1–8). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E. Z., Tan, H. C., Sessions, O. M., Ward, A. M., Gubler, D. J., Harris, E., Garcia-blanco, M. A., & Ooi, E. E. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, *350*(6257), 217–221.
- Mazeaud, C., Freppel, W., & Chatel-Chaix, L. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Frontiers in Genetics*, *9*(595). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00595>
- McElroy, K. L., Santiago, G. A., Lennon, N. J., Birren, B. W., Henn, M. R., & Muñoz-Jordán, J. L. (2011). Endurance, Refuge, and Reemergence of Dengue Virus Type 2, Puerto Rico, 1986–2007. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(1), 64–71. <https://doi.org/10.3201/eid1701.100961>
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M. P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., & Amara, A. (2012). The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host & Microbe*, *12*(4), 544–557. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.08.009>
- Montes-Gómez, A. E., García-Cordero, J., Marcial-Juárez, E., Shrivastava, G., Visoso-Carvajal, G., Juárez-Delgado, F. J., Flores-Romo, L., Sanchez-Torres, M. C., Santos-Argumedo, L., Bustos-Arriaga, J., & Cedillo-Barrón, L. (2020).

Crosstalk Between Dermal Fibroblasts and Dendritic Cells During Dengue Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.538240>

Moreno-Estrada, A., Gignoux, C. R., Fernández-López, J. C., Zakharia, F., Sikora, M., Contreras, A. V., Acuña-Alonzo, V., Sandoval, K., Eng, C., Romero-Hidalgo, S., Ortiz-Tello, P., Robles, V., Kenny, E. E., Nuño-Arana, I., Barquera-Lozano, R., Macín-Pérez, G., Granados-Arriola, J., Huntsman, S., Galanter, J. M., ... Bustamante, C. D. (2014). The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*, 344(6189), 1280–1285. <https://doi.org/10.1126/science.1251688>

Morrison, J., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2012). Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses*, 4(3), 397–413. <https://doi.org/10.3390/v4030397>

Munoz-Jordan, J. L., Sanchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., & Garcia-Sastre, A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14333–14338. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>

Naoki, O., Arihiro, K., Toshiyuki, Y., Noriko, H., Fumio, K., Suyoshi, S., Makoto, K., Kentaro, H., & Hattori, M. (2014). The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 21(6), 673. <https://doi.org/10.1093/DNARES/DSU029>

Nicholls, C. M. R., Sevana, M., & Kuhn, R. J. (2020). Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. In *Advances in Virus Research* (pp. 33–83). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.08.003>

Oeser, C., & Ladhani, S. (2019). An update on Zika Virus and Congenital Zika Syndrome. *Paediatrics and Child Health*, 29(1), 34–37. <https://doi.org/10.1016/J.PAED.2018.10.010>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2009). *Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44504/9789995479213_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Piebler, J., Thomas, C., Christopher Garcia, K., & Schreiber, G. (2012). Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunological Reviews*, 250(1), 317. <https://doi.org/10.1111/IMR.12001>

Pijlman, G. P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W. J., Palmenberg, A. C., Shi, P. Y., Hall, R. A., & Khromykh, A. A. (2008). A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host and Microbe*, 4(6), 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.007>

Pozo-Aguilar, J. O., Monroy-Martínez, V., Díaz, D., Barrios-Palacios, J., Ramos,

- C., Ulloa-García, A., García-Pillado, J., & Ruiz-Ordaz, B. H. (2014). Evaluation of host and viral factors associated with severe dengue based on the 2009 WHO classification. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0590-7/TABLES/7>
- Quintero Gil, D. C., Osorio Benítez, J. E., & Martínez-Gutiérrez, M. (2010). Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia*, 23(2), 146–156. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180519015006>
- Rathore, A. P. S., & St John, A. L. (2018). Immune responses to dengue virus in the skin. *Open Biology*, 8(8). <https://doi.org/10.1098/RSOB.180087>
- Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 537–551. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>
- Rodriguez-Madoz, J. R., Belicha-Villanueva, A., Bernal-Rubio, D., Ashour, J., Ayllon, J., & Fernandez-Sesma, A. (2010). Inhibition of the Type I Interferon Response in Human Dendritic Cells by Dengue Virus Infection Requires a Catalytically Active NS2B3 Complex. *Journal of Virology*, 84(19), 9760–9774. <https://doi.org/10.1128/JVI.01051-10>
- Sakuntabhai, A., Turbpaiboon, C., Casadémont, I., Chuansumrit, A., Lowhnoo, T., Kajaste-Rudnitski, A., Kalayanaroj, S. M., Tangnaratchakit, K., Tangthawornchaikul, N., Vasanawathana, S., Chaiyaratana, W., Yenchitsomanus, P., Suriyaphol, P., Avirutnan, P., Chokephaibulkit, K., Matsuda, F., Yoksan, S., Jacob, Y., Lathrop, G. M., ... Julier, C. (2005). A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature Genetics*, 37(5), 507. <https://doi.org/10.1038/NG1550>
- Schmid, M. A., & Harris, E. (2014). Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathogens*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004541>
- Secretaría de Salud. (2018). *Casos confirmados de Síndrome de Guillain-Barré asociado a Zika en México*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/390724/ZIKA_SxGB_060218.pdf
- Secretaría de Salud. (2021). *Casos confirmados por laboratorio de Síndrome Congénito asociado a Zika, México 2016 - 2021*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/652543/Cuadro_SCAZ_CONFIRMADOS_Laboratorio_28junio2021.pdf
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & Consortium, I. R. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 98(1), 2. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.000672>

- Slonchak, A., & Khromykh, A. A. (2018). Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research. *Antiviral Research*, 159, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.006>
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 308, 50–64. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2017.03.001>
- Soo, K. M., Khalid, B., Ching, S. M., & Chee, H. Y. (2016). Meta-Analysis of Dengue Severity during Infection by Different Dengue Virus Serotypes in Primary and Secondary Infections. *PLOS ONE*, 11(5), e0154760. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0154760>
- Talarico, L. B., Byrne, A. B., Amarilla, S., Lovera, D., Vázquez, C., Chamorro, G., Acosta, P. L., Ferretti, A., Caballero, M. T., Arbo, A., & Polack, F. P. (2017). Characterization of type I interferon responses in dengue and severe dengue in children in Paraguay. *Journal of Clinical Virology*, 97, 10–17. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2017.10.010>
- Villordo, S. M., Filomatori, C. V., Sánchez-Vargas, I., Blair, C. D., & Gamarnik, A. V. (2015). Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation. *PLOS Pathogens*, 11(1), e1004604. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004604>
- Wan, S. W., Wu-Hsieh, B. A., Lin, Y. S., Chen, W. Y., Huang, Y., & Anderson, R. (2018). The monocyte-macrophage-mast cell axis in dengue pathogenesis. *Journal of Biomedical Science*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/S12929-018-0482-9>
- Weaver, S. C., Forrester, N. L., Liu, J., & Vasilakis, N. (2021). Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. *Nature Reviews Microbiology* 2021 19:3, 19(3), 184–195. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00482-8>
- WHO. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: New edition. In *WHO Press* (Vol. 2, Issue 1).
- Wong, K. L., Chen, W., Balakrishnan, T., Toh, Y. X., Fink, K., & Wong, S. C. (2012). Susceptibility and Response of Human Blood Monocyte Subsets to Primary Dengue Virus Infection. *PLoS ONE*, 7(5), 36435. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036435>
- Zevini, A., Olganier, D., & Hiscott, J. (2017). Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends in Immunology*, 38(3), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.12.004>