



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN
UN CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA MICROVASCULATURA
CEREBRAL HUMANA INFECTADO CON EL VIRUS DE ZIKA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. RUVALCABA HERNÁNDEZ PAMELA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA CAMPOS BEDOLLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN
UN CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA MICROVASCULATURA
CEREBRAL HUMANA INFECTADO CON EL VIRUS DE ZIKA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. RUVALCABA HERNÁNDEZ PAMELA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA CAMPOS BEDOLLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0687/2023
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 **19 de junio de 2023** 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 **RUVALCABA HERNÁNDEZ PAMELA** con número de cuenta **308298275** con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN UN CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA MICROVASCULATURA CEREBRAL HUMANA INFECTADO CON EL VIRUS DE ZIKA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PATRICIA CAMPOS BEDOLLA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ BUSTOS ARRIAGA
Vocal: DRA. MARÍA ROSALÍA LIRA CARMONA
Vocal: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ
Vocal: DRA. MARÍA ROSA DE LOURDES ÁVILA COSTA
Secretario: DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 7 de septiembre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno
AGNS/RCHT/EARR/rcht

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Mi más profundo agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el lugar, el gran aporte académico y la respetable formación profesional durante estos dos años.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el invaluable apoyo con la beca otorgada para el desarrollo y óptima conclusión de mis estudios de maestría (**CVU: 1033473**).

A la Dra. Patricia Campos Bedolla por fungir como tutora principal de esta tesis.

Con gran admiración y un especial agradecimiento al Dr. José Arellano Galindo por su invaluable apoyo, compromiso, conocimiento y tutoría durante el desarrollo de este proyecto.

Muy agradecida con la Dra. Diana María Escalante Alcalde por su valiosa guía, sus comentarios constructivos y su gran profesionalismo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

De corazón a la Universidad Nacional Autónoma de México por la maravillosa oportunidad de formar parte de ella, el crecimiento profesional y calidad educativa ofrecidas.

A la Facultad de Medicina por su gran calidad académica y profesional.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, por la oportunidad de trabajar dentro de sus instalaciones.

A la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas (UIMEN) por el espacio y el aprendizaje obtenidos.

A la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Laboratorio de Virología. Hospital Infantil de México "Federico Gómez" por permitirme desarrollar gran parte del proyecto dentro de sus instalaciones.

Al Laboratorio de Biología del desarrollo y teratogénesis experimental. Unidad de Investigación en malformaciones congénitas. Hospital Infantil de México "Federico Gómez" por su aporte y colaboración en este trabajo.

A los doctores María Rosa de Lourdes Ávila Costa, Beatriz Gómez González, María Rosalía Lira Carmona, José Bustos Arriaga y José Arellano Galindo por su invaluable apoyo y fungir como sinodales.

A los doctores Sandra Orozco Suárez, Sergio Zavala Vega, Ricardo Jaime Cruz, Raúl Flores Mejía, Denisse Añorve Bailón, al M. en C. de la salud José Eduardo Márquez García y a la QFB. Emma Rosario Mendoza García por su guía, invaluable apoyo y amplia experiencia en el desarrollo del proyecto.

A mi país México, del que me siento orgullosa.

DEDICATORIAS

La mayor de todas para Guillermo Ruvalcaba por su invaluable apoyo y confianza incondicional, su siempre acertada guía, consejos, amor y su comprensión durante todo el proceso de la maestría. Eres el mejor ejemplo de la persona que me gustaría llegar a ser ¡Te amo papá!

A Griselda M. Hernández[†] por su infinito amor, su dedicación y su apoyo incondicional, porque a pesar de tu ausencia a la mitad del camino, siempre continuaste siendo mi mayor inspiración para cumplir este sueño y concluirlo ¡Te amo mamá!

A Rubén Hernández y Patricia Nagay por su gran cariño, apoyo y fortaleza durante este difícil periodo. Gracias por ser tan maravillosa familia y estar presentes siempre.

A mis hermanas Debby y Jacky Hernández Nagay por su cariño, paciencia, complicidad y compañía de toda la vida ¡las amo!

A Irma Deleón Rodríguez[†] por ser mi mayor inspiración como bióloga y ayudarme a encontrar mi pasión por la investigación.

A María del Consuelo Rivera por su enorme apoyo incondicional y maravillosa amistad por más de 10 años, nuestras reuniones “de adultos” y reír de nuestras desgracias. A pesar de nuestras ocupaciones siempre estuviste conmigo y para mí ¡Gracias, hermana!

A Tania Salazar Soto por compartirme su gran experiencia de vida, su invaluable amistad, hermandad, apoyo incondicional, consejos, inspiración para ser mejor y no rendirme nunca. Por recordarme lo mucho que puedo dar, hacer y lograr ¡Gracias, luna!

A Juan Antonio González por su infinita paciencia, horas de charlas, ánimos, por estar ahí cuando sentía que no podía más, estoy profundamente agradecida por cada momento en estos 12 años de amistad. ¡Te quiero bro!

A Violeta Fátima García por su infinita paciencia, complicidad, chelas, charlas y brindarme ánimos, por su gran amistad y hermandad incondicional en cada momento ¡Te adoro mujercita!

A Raúl Sánchez y Angélica Rojas por su amistad ¡Gracias, chicos!

A Alejandra Pérez Gómez por su amistad, cariño y apoyo incondicional, por no dejarme sola y por la maravillosa oportunidad de encontrar una hermana en ti.

A Gabriela Sánchez Fabila y Roberto Moreno Colin por su gran amor, apoyo incondicional, aprendizajes de vida y guía, por adoptarnos como hijas académicas y siempre tener las puertas abiertas para nosotras. Por su orientación, conocimientos y gran profesionalismo.

A Edgar Ruíz por su invaluable apoyo, confianza y cuidado durante este periodo, eres alguien importante ¡Te quiero mucho!

A Gerardo Esquivel por continuar apoyándome aún después de tantos años ¡Eres un gran amigo!

A Josué Yerena y Alexia Montes por su gran apoyo personal y académico, amistad y gratos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. ¡Son invaluableles amigos!

A Ricardo Ibarra (Richard), Celedonio Ramírez (Celes), Blanca Lechuga, Víctor Herrera y Mario Morones por su apoyo y grata compañía en el laboratorio. Fue genial compartir esto con ustedes.

A Hendrick Cabrera, Aniller Rodríguez, Miriam Sánchez y Elizabeth Bautista por su grandiosa amistad, grata compañía y el placer de trabajar con ustedes.

A Claudia Segoviano por su grandiosa amistad y comprensión, por esos momentos únicos en Fucam.

A Yaz, Vicky y David por sus ánimos, confianza, el apoyo durante este tiempo y el honor de trabajar con ustedes ¡son grandes personas y profesionistas!

A Enid, Aria y Mitsu por su tierna compañía.

Agradezco a todas aquellas personas que contribuyeron de forma positiva en el desarrollo de este gran proyecto y me impulsaron a mejorar en ámbitos académicos y personales.

El futuro y la amplitud del conocimiento solo se pueden mantener y desarrollar si tratamos con dignidad e integridad a los que vienen detrás y nos abrimos a compartir la experiencia y saber adquiridos.

“La ciencia humana consiste más en destruir errores que en descubrir verdades”

-Sócrates-

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
<i>Virus de Zika</i>	5
<i>Efectos neurológicos del Virus del Zika</i>	14
<i>La Barrera Hematoencefálica</i>	20
<i>El ZIKV y su ingreso al Sistema Nervioso Central</i>	28
<i>Efecto interplay viral</i>	32
OBJETIVOS.....	34
<i>Objetivo general</i>	34
<i>Objetivos particulares</i>	34
ANTECEDENTES.....	35
METODOLOGÍA.....	38
<i>Obtención del título viral de ZIKV por TCID 50</i>	38
<i>Cultivo de fibroblastos (HFF) e inoculación con ZIKV MR-766</i>	39
<i>Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)</i>	40
<i>Cultivos de células endoteliales de cerebro humano (HBEC-5i) e inoculación con el ZIKV</i>	41
<i>Expresión de claudina -3 en % de Gates por citometría de flujo</i>	43
<i>Expresión de claudina -3 en Intensidad Media de Fluorescencia (MIF) por citometría de flujo</i>	44
<i>Análisis estadístico</i>	44
RESULTADOS.....	45
<i>Obtención del título viral por TCID 50 en células A549</i>	45
<i>Cultivos primarios de fibroblastos (HFF) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</i>	46
<i>Cultivos de células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (HBEC-5i) e inoculación con ZIKV</i>	48

Expresión de claudina -3 por citometría de flujo en Células Endoteliales de Cerebro Humano (HBEC-5i).....	50
Expresión de claudina -3 en unidades de fluorescencia (píxeles) en células HBEC-5i.....	52
Expresión de claudina -3 (% de Gates) en células HBEC-5i.....	58
Expresión de claudina -3 (% de Gates) en células HBEC-5i en el tiempo.....	70
Expresión de claudina -3 (MIF) en células HBEC-5i.....	76
Expresión de claudina -3 (MIF) en células HBEC-5i en el tiempo.	88
Expresión de la claudina -3 (% de Gates) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2). ...	94
Expresión de la claudina -3 (MIF) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2).....	97
Expresión de la claudina -3 (% de Gates) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2) respecto al tiempo.	100
Expresión de la claudina -3 (MIF) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2) respecto al tiempo.....	103
DISCUSIÓN.....	106
CONCLUSIONES.....	116
PERSPECTIVAS.....	117
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXOS.....	127
ANEXO I Estandarización de anticuerpos con fibroblastos de prepucio (HFF)....	127
ANEXO II Inmunofluorescencia indirecta en células HBEC-5i con 0.1 MOI	129
ANEXO III Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por ZIKV en México 2015-2023.....	130
ANEXO IV. Dotplots representativos del tamaño y la granularidad de la población de células HBEC-5i.	138
ANEXO V Dotplots de la fluorescencia basal de las células HBEC-5i.....	139
ANEXO VI. Dotplots e histogramas de las subpoblaciones de células HBEC-5i por fluorescencia.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	TÍTULO	PÁGINA
1	Estructura del virus de Zika (ZIKV).	7
2	Genoma viral del ZIKV. Proteínas estructurales y no estructurales.	7
3	Ciclo de replicación viral del Zika (ZIKV).	10
4	Mapa epidemiológico del ZIKV año 2022.	11
5	Ciclo zoonótico del ZIKV.	12
6	Infección materna y transmisión vertical del ZIKV.	13
7	Microcefalia neonatal.	16
8	Síndrome Guillain-Barré. Daño en vainas de mielina axonales y exposición de fibras nerviosas.	17
9	Daño periférico por desmielinización axonal a causa de la liberación de citocinas proinflamatorias y anticuerpos que destruyen la mielina.	18
10	Barrera Hematoencefálica (BHE).	21
11	Unidad Neurovascular (UNV).	22
12	Proteínas de unión estrecha presentes en el endotelio cerebral.	27
13	Mecanismos de cruce celular en la BHE.	28
14	Diseminación del ZIKV hacia el parénquima celular.	30
15	Diapédesis celular	31
16	Efecto citopático (CPE) en células A549.	46
17	Formación de focos de infección en células A549.	47
18	Cultivo de células endoteliales cerebrales humanas (HBEC-5i).	48
19	Cultivo en placa de células HBEC-5i.	49
20	Efecto citopático (CPE) en células HBEC-5i a las 24 h p.i.	49
21	Expresión de fluorescencia de la claudina -3 por citometría de flujo.	51
22	Expresión de claudina -3 en células HBEC-5i a 30 min y 1 h p.i. MOI 0.1 por microscopía confocal.	54
23	Expresión de claudina -3 en células HBEC-5i a 3 y 6 h p.i a MOI 1.0 por microscopía confocal.	55
24	Expresión de claudina -3 en células HBEC-5i a 12 y 24 h p.i a MOI 10 por microscopía confocal.	56

25	Expresión de la claudina -3 en unidades de fluorescencia (píxeles) en células HBEC-5i.	57
26	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la población total de células HBEC-5i.	61
27	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la SP1 de células HBEC-5i.	65
28	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la SP2 de células HBEC-5i.	69
29	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la población total de células HBEC-5i a diferentes tiempos.	71
30	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la SP1 de células HBEC-5i a diferentes tiempos.	73
31	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la SP2 de células HBEC-5i a diferentes tiempos.	75
32	Expresión de claudina -3 (MIF) en la población total de células HBEC-5i.	79
33	Expresión de claudina -3 (MIF) en la SP1 de células HBEC-5i.	83
34	Expresión de claudina -3 (MIF) en la SP2 de células HBEC-5i.	87
35	Expresión de claudina -3 (MIF) en la población total de células HBEC-5i a diferentes tiempos.	89
36	Expresión de claudina -3 (MIF) en la SP1 de células HBEC-5i a diferentes tiempos.	91
37	Expresión de claudina -3 (MIF) en la SP2 de células HBEC-5i a diferentes tiempos.	93
38	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en SP1 vs SP2 con 0.1, 1.0 y 10 MOI virales.	96
39	Expresión de claudina -3 (MIF) en SP1 vs SP2 con 0.1, 1.0 y 10 MOI virales.	99
40	Expresión de claudina -3 (% de Gates) en SP1 vs SP2 a diferentes tiempos	102
41	Expresión de claudina -3 (MIF) en SP1 vs SP2 a diferentes tiempos	105
42	Cultivo de fibroblastos (HFF)	127
43	Diluciones del anticuerpo primario contra claudina -3 en células HFF	128
44	Expresión de claudina-3 en células HBEC-5i infectadas con 0.1 MOI.	129
45	Dotplot que representa granularidad vs tamaño en células HBEC-5i.	138

46	Dotplot que representa la fluorescencia basal de las células HBEC-5i.	139
47	Expresión del claudina -3 a 30 min p.i en células HBEC-5i.	140
48	Expresión del claudina -3 a 1 h p.i en células HBEC-5i.	141
49	Expresión del claudina -3 a 6 h p.i en células HBEC-5i.	142
50	Expresión del claudina -3 a 12 h p.i en células HBEC-5i.	143
51	Expresión del claudina -3 a 24 h p.i en células HBEC-5i.	144

Las ilustraciones fueron realizadas con el programa Biorender

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Valores de claudina -3 en unidades de fluorescencia (píxeles) en población total de células HBEC-5i.	53
2	Valores de fluorescencia totales (% de Gates) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes MOI y tiempos.	60
3	Valores de fluorescencia en la SP1 (% de Gates) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes MOI y tiempos	64
4	Valores de fluorescencia en la SP2 (% de Gates) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes MOI y tiempos	68
5	Valores de fluorescencia totales (MIF) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes MOI y tiempos	78
6	Valores de fluorescencia en SP1 (MIF) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes MOI y tiempos	82
7	Valores de fluorescencia en SP2 (MIF) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes MOI y tiempos	86

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AJ	Uniones adherentes
AEC	Aminoetilcarbazol
BHE/BBB	Barrera Hematoencefálica
BMEC	Células endoteliales microvasculares cerebrales
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Proteína de cápside
CPE	Efecto citopático
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Proteína de envoltura
ECGF	Factor de crecimiento endotelial
HBEC-5i	Células endoteliales humanas cerebrales
HMEC/D3	Células endoteliales microvasculares humanas
iBEC	Células endoteliales cerebrales inducidas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Proteína de membrana
MEM	Medio mínimo esencial
MIF	Intensidad media de fluorescencia
MOI	Multiplicidad de infección
NK	Asesinas naturales
NS	Non structural protein
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina amortiguadora/tamponada
PRM	Proteína precursora de membrana
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido Ribonucleico
SCZ	Síndrome congénito de Zika
SFB	Suero fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SN	Sistema Nervioso

SNC/CNS	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SP1	Subpoblación 1
SP2	Subpoblación 2
TCID50	Dosis media infectiva 50
TEER	Resistencia eléctrica transendotelial
TJs	Uniones estrechas
UNV	Unidad Neurovascular
ZIKV	Virus de Zika
ZO (-1,-2 y -3)	<i>Zonula occludens</i> -1, -2 y -3

Algunas abreviaturas corresponden a las siglas en inglés

RESUMEN

El virus de Zika (ZIKV) ha sido considerado un problema de salud pública importante, por su relación con padecimientos neurológicos como el síndrome congénito por ZIKV (SCZ), la microcefalia fetal y neonatal y el síndrome de Guillain-Barré (SGB). Se ha sugerido que, la infección por ZIKV puede causar disrupción en la barrera hematoencefálica (BHE), que se manifiesta a través de modificaciones en la estructura y función de las uniones estrechas (TJs), en la permeabilidad y la resistencia eléctrica transendotelial (TEER). Las principales claudinas presentes en el endotelio de la BHE son las claudinas -1, -3 y -5, que limitan el paso de agentes nocivos al Sistema Nervioso Central (SNC). No obstante, la claudina -3 ha sido escasamente estudiada en el endotelio microvascular cerebral. Se ha descrito a esta proteína como un elemento importante que, junto con las otras claudinas, participa en el estrechamiento de la vía paracelular, ayuda a mantener una TEER alta, regula el intercambio entre la sangre y el cerebro y mantiene un microambiente neuronal homeostático óptimo. La claudina -3 también es descrita como un marcador importante de inflamación, ya que se ha observado pérdida en su expresión durante estados patológicos en el SNC. Se sugiere que la reducción o ausencia de claudina -3 en el endotelio puede estar relacionada con un mayor ingreso de elementos ajenos al SNC. Por esta razón decidimos evaluar la expresión de claudina -3 en células endoteliales cerebrales humanas (HBEC-5i), infectadas con la cepa MR-766 del ZIKV con diferentes multiplicades de infección (MOI) (0.1, 1.0 y 10), y a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h), utilizando como técnicas la inmunofluorescencia indirecta y la citometría de flujo en % de Gates (% de células

positivas a claudina-3) e Intensidad Media de Fluorescencia (MIF). Nuestros resultados mostraron disminución significativa en la expresión de claudina -3 con la menor MOI (0.1) en las células HBEC-5i en presencia del ZIKV; sin embargo, con MOI de 10 se observó la mayor reducción de la proteína en el tiempo. En este trabajo, también obtuvimos dos respuestas en las células, relacionadas con la expresión de claudina -3 post exposición al ZIKV (0.1, 1 y 10 MOI) a los distintos tiempos, definidas por la citometría de flujo. De este modo, consideramos la presencia de dos subpoblaciones (SP1 y SP2) en la misma población. La SP1 presentó reducción en la expresión de la claudina -3 en presencia del ZIKV, mientras que la SP2 mostró incremento. Nosotros proponemos que estas diferencias en la expresión pueden deberse a una respuesta celular diferente en algunas células o a un efecto de interacción o interplay entre los mecanismos celulares y virales. Este efecto puede sugerir la acción del ZIKV para controlar la maquinaria celular y favorecer sus procesos de replicación, mientras que la célula trata de mantener su homeostasis y compensar el daño viral. Se determinó que la expresión de la claudina -3 se reduce en las células HBEC-5i en presencia del ZIKV y que depende de la carga viral y el tiempo de infección, posiblemente comprometiendo la integridad de la BHE. Por lo que consideramos que este trabajo tiene un aporte significativo y novedoso en el conocimiento de la expresión de la claudina -3 ante la exposición al ZIKV en células endoteliales cerebrales humanas.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) has been considered an important public health issue due to its association with many neurological conditions such as congenital ZIKV syndrome (CZS), foetal and neonatal microcephaly and Guillain-Barré Syndrome (GBS). It has been suggested that ZIKV infection may cause Blood brain barrier (BBB) disruption related to many structural and functional changes in tight junction proteins (TJs), permeability, and transendothelial electrical resistance (TEER). The major proteins expressed in BBB endothelium are claudins -1, -3 and -5, whose main function is to limit harmful agents into the Central Nervous System (CNS). However, claudin -3 has been scarcely studied in microvascular brain endothelium. It seems that claudin -3 alongside the other claudins might be an important element that tightens the paracellular pathway, maintains a high TEER, regulates the exchange between the blood and the brain and provides an optimal homeostatic neuronal environment. This protein is also described as a key inflammation marker due to its loss during pathological states in the CNS. It has been suggested that the reduction or absence of this protein in brain endothelium might be related to greater access to non-CNS elements. In the present work, we evaluated claudin -3 expression in human brain endothelial cells (HBEC-5i) infected with ZIKV MR-766 with different multiplicities of infection (0.1, 1.0 and 10 MOI) at different times (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) using indirect immunofluorescence (IFI) and flow cytometry techniques represented in % of Gates (% of positive cells to claudin -3) and Mean Intensity of fluorescence (MIF). Our results showed a significant reduction in claudin -3 expression with ZIKV, even with the lowest MOI (0.1). Nevertheless, we observed a significant decrease with a

MOI of 10 over time. In this work, we also determined two different responses in claudin -3 expression after viral exposure (0.1, 1.0 and 10 MOI), at different times defined by flow cytometry. Thus, we considered two different cellular subpopulations (SP1 and SP2) based on claudin -3 expression. SP1 subpopulation showed a decreased claudin -3 expression with all viral loads at different times. Conversely, the SP2 subpopulation had an increased expression. We proposed that these differences in claudin -3 expression may occur due to different cell responses in some cells or to the interplay effect between cell and viral mechanisms. This effect may induce ZIKV to control the cell machinery to promote viral replication processes meanwhile the cells try to maintain homeostasis and to offset viral damage. We determined that claudin -3 expression decreased in HBEC-5i cells by ZIKV and may depend on viral loads and exposition time, compromising BBB's integrity. We considered that this work has a significant and novel contribution in claudin -3 expression with ZIKV MR-766 in HBEC-5i cells.

INTRODUCCIÓN

Virus de Zika

La Organización Mundial de la Salud declaró la epidemia del virus Zika (ZIKV), como una emergencia de salud pública de importancia internacional (PHEIC, por sus siglas en inglés) de febrero a noviembre de 2016, debido a la relación de la infección del ZIKV con malformaciones congénitas, como la microcefalia fetal y neonatal (1-3). Se ha definido que existe una asociación directa del virus con padecimientos neurológicos importantes, como el síndrome de Guillain-Barré en adultos, y el síndrome congénito por Zika (SCZ), que incluye un espectro de patologías pre y post natales como la encefalitis, mielitis, encefalopatía, neuropatía, epilepsia, parálisis cerebral y discapacidad intelectual en lactantes (1, 4-6).

El ZIKV pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*. El ZIKV es un virus esférico envuelto con un diámetro de aproximadamente 45 nm, de cápside icosaédrica, que contienen una cadena de RNA de sentido positivo con extremos UTR 5' y 3', un único marco de lectura (ORF), una estructura CAP en su extremo 5' y no posee cola poli A en su extremo 3' (7, 8).

Los *arbovirus* incluyen virus de diversas familias que se caracterizan por transmitirse de un vector artrópodo (mosquitos o garrapatas) a un hospedero vertebrado. El ZIKV forma parte de este grupo, que es considerado de importancia médica por sus efectos nocivos a la salud. La infección por estos virus puede ser asintomática o presentar complicaciones graves que pueden terminar en la muerte. Ejemplo de ello son los virus del Nilo Occidental, Dengue y Zika, que se relacionan

con encefalitis, meningitis y fiebres hemorrágicas y en el caso específico de Zika se relaciona con muerte fetal (9-11). Los principales vectores de transmisión corresponden a las especies de mosco *Aedes aegypti* y *A. albopictus* (10, 12).

En el género *Flavivirus*, se incluyen también a más de 70 virus, entre los que se encuentran el de la fiebre amarilla, encefalitis japonesa, del Nilo occidental y dengue, entre otros. Esta clasificación se considera con base en su estructura, rango de hospederos, vectores transmisores y su capacidad de causar potenciales pandemias; asimismo, por su epidemiología, virulencia y sus asociaciones con padecimientos patológicos similares dentro del campo neurológico (13-15).

Con respecto a su organización genómica, el ZIKV posee un genoma RNA monocatenario de sentido positivo, que funciona como RNA mensajero. Durante el proceso de traducción, se genera una poliproteína que al ser escindida da origen a las 3 proteínas estructurales que corresponden a la proteína de cápside (C), de envoltura (E) y precursora de membrana (prM) o de membrana (M) y a las 7 no estructurales del virus (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (7, 16-18).

Las 3 proteínas estructurales están relacionadas principalmente con la estructura y composición del virión, la protección del material genético ante la degradación enzimática producida por el hospedero, la unión a las células blanco y la patogénesis viral (7, 16).

Las 7 proteínas no estructurales son de gran relevancia, ya que, aunque no están ensambladas en el virión, tienen una importante función en los procesos de entrada a la célula, traducción, replicación, morfogénesis, modulación y evasión

inmunológica, así como la activación de genes que codifican la producción de las proteínas virales (**Fig.1 y 2**) (7, 16, 19).

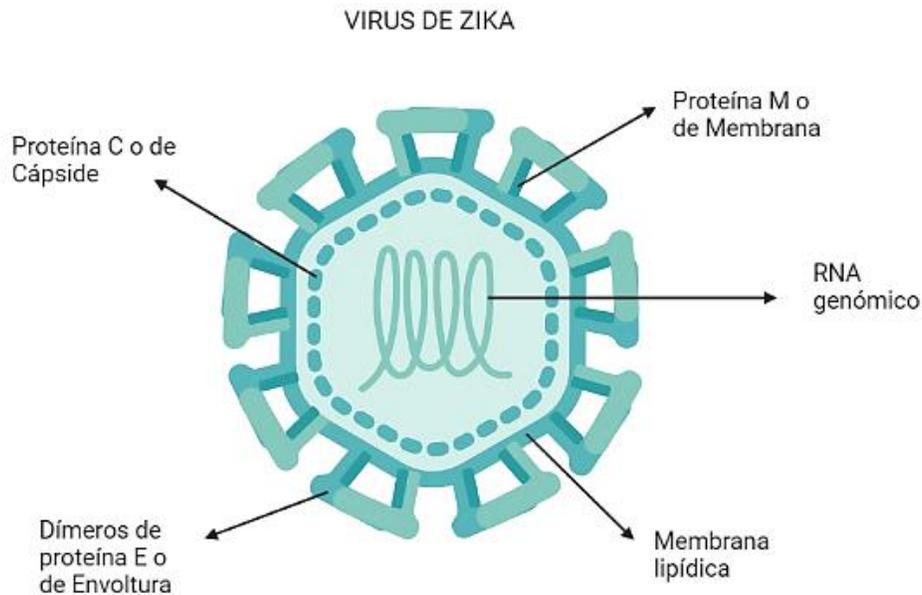


Figura 1. Estructura del virus de Zika (ZIKV). Proteínas estructurales: envoltura (E), cápside (C) y membrana (M).



Figura 2. Organización genómica del ZIKV. Proteínas estructurales y no estructurales. Imagen tomada de Christian, 2019 (20).

Se ha identificado un solo serotipo y tres linajes principales del ZIKV, que corresponden al linaje africano del este, el linaje africano del oeste y el linaje asiático. Algunos autores mencionan un cuarto linaje derivado de la cepa asiática de origen americano. Las principales diferencias entre estos linajes están basadas en su genética, por lo que varía su grado de virulencia y patogenicidad (21-27). La

cepa MR-766 (African lineage, Uganda, 1947 GB: AY632535.2) se relaciona con un mayor índice de infección y mortalidad celular en el Sistema Nervioso Central (SNC). Además, ha sido caracterizada de manera muy amplia a nivel genético, lo que determina su uso dentro del área de investigación neurológica (28, 29).

El ciclo de replicación del ZIKV comienza con la unión de la glicoproteína E de la superficie viral con los receptores celulares (ej. AXL, TYRO3, TIM, TAM y DC-SIGN) de las células blanco, que son principalmente células dendríticas, células neurales progenitoras, de la glía radial, microglía, astrocitos y células endoteliales. Posteriormente el virión es internalizado en la célula mediante un proceso conocido como endocitosis mediada por receptor, el cual inicia con la unión del ligando a los receptores acoplados a proteínas citosólicas adaptadoras (AP). Las proteínas citosólicas endocíticas comienzan a agruparse en la cara interna de la membrana plasmática y reclutan proteínas de cubierta concentrándolas en regiones específicas de la membrana (30).

En este punto los viriones se concentran en las regiones cubiertas de la membrana y esto provoca que la membrana se curve y se invagine, formando la vesícula de clatrina. El proceso de corte se realiza en el cuello de la invaginación liberando la vesícula de la membrana plasmática y permitiendo que sea transportada dentro de la célula. Una vez dentro de la célula, el virión es llevado en la vesícula a un compartimento pre lisosomal endocítico, que se caracteriza por tener un pH bajo. El pH ácido induce la fusión de membranas celular y viral, a continuación, ocurre un cambio conformacional en la proteína E del virus (de un

dímero a un trímero) y se libera la nucleocápside viral en el citosol celular (7, 18, 31, 32).

El siguiente paso tras la liberación del genoma viral en el citosol celular, corresponde a la unión de las proteínas no estructurales al retículo endoplásmico (RE). El virus inducirá entonces una reorganización de los filamentos intermedios y redes de microtúbulos del citoesqueleto celular para formar compartimentos membranosos que le permitan llevar a cabo el proceso de replicación. El complejo de vesículas generado a partir de las invaginaciones por el reordenamiento del RE brindará estructura para contener los viriones producidos hasta su traslado hacia el aparato de Golgi y su posterior liberación extracelular. Asimismo, se iniciará simultáneamente el proceso de traducción, que consiste en la producción de la poliproteína que dará origen a las proteínas estructurales y no estructurales para la formación de nuevos viriones (**Fig. 3**) (7, 33, 34).

El transporte vesicular, un mecanismo celular que puede ser manipulado por el virus durante la infección, permite que los viriones inmaduros del ZIKV sean trasladados a través de la red de cisternas del RE para el proceso de adición de carbohidratos mientras son dirigidos hacia el aparato de Golgi. A estos viriones también se les asocian heterodímeros de las proteínas prM/E, importantes en el proceso de maduración final, que ocurre cuando una enzima furina del hospedero procesa proteolíticamente la proteína prM en pr y M. Este proceso permite la separación de las proteínas de envoltura (E) y al concluir esto, los viriones estarán listos para ser liberados. Finalmente, en algunos casos se describe un proceso de apoptosis celular anterior a la liberación de los viriones maduros por exocitosis al

sistema linfático y al torrente sanguíneo donde se diseminará y continuará el proceso de infección sistémica (**Fig. 3**) (7, 33, 35).

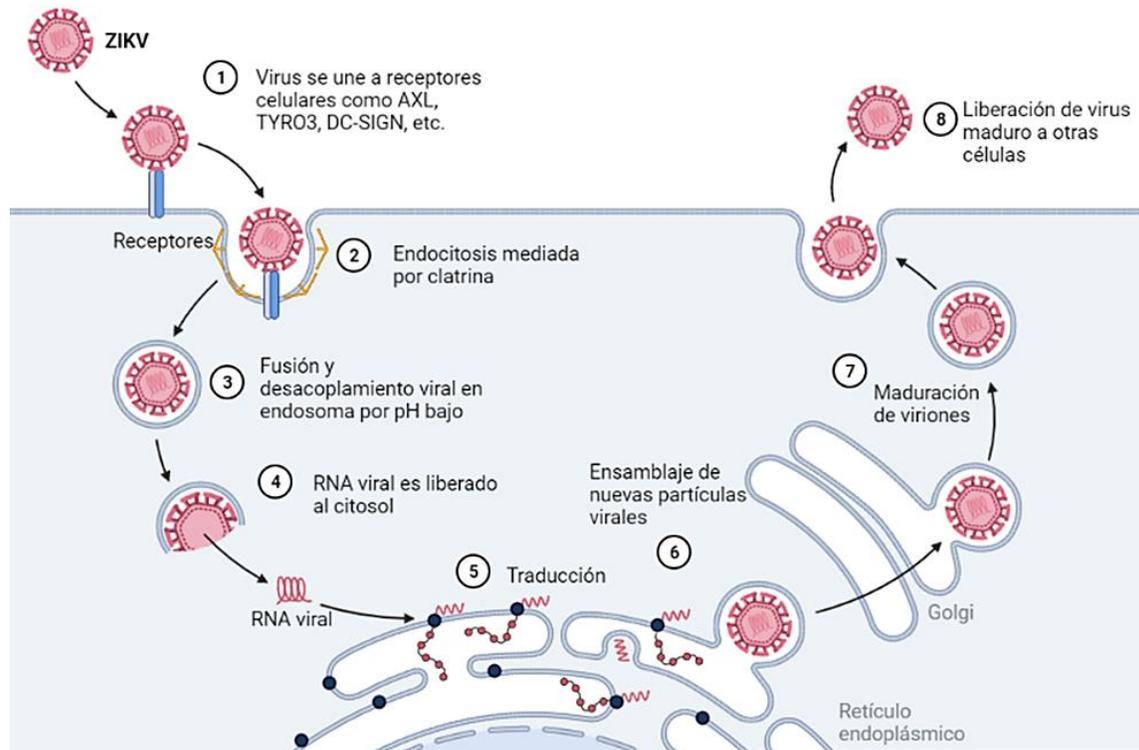


Figura 3. Ciclo de replicación del Zika (ZIKV). 1. Unión de la proteína E del ZIKV con los receptores celulares (AXL, TYRO3, DG-SIGN). 2. Proceso de endocitosis de los viriones en vesículas de clatrina y fusión con endosomas. 3. Fusión de membranas viral y celular, desacoplamiento de la partícula por pH ácido. 4. Liberación del genoma viral en el citosol celular. 5. Proceso de transcripción y traducción del RNA viral en el retículo endoplásmico (RE). 6. Formación de nuevas partículas virales a partir de la escisión de la poliproteína generada. 7. Maduración y adición de glicoproteínas y lípidos a las partículas formadas en el aparato de Golgi, corte de la proteína precursora de membrana (prM) en pr y M por una enzima furina. 8. Proceso de exocitosis de los viriones, puede ocurrir apoptosis de la célula.

El ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Zika en Uganda durante el desarrollo de una investigación sobre la fiebre amarilla (17, 18, 36). Posteriormente, fue aislado del mosquito del género *Aedes* en 1948 y la primera infección humana fue reportada en Nigeria en 1954 (37, 38). Es hasta 1966 que se

El ciclo zoonótico de transmisión del ZIKV, a diferencia de otros flavivirus, puede mantenerse activo y continuo mediante la interacción mosquito-humano-mosquito (**Fig. 5**) (15). Se ha descrito que el virus puede ser transmitido también de persona a persona por vía hematológica (transfusiones de sangre), vía sexual a través de los fluidos vaginales y el semen y por transmisión vertical durante la etapa gestacional (**Fig. 6**) (48-51).

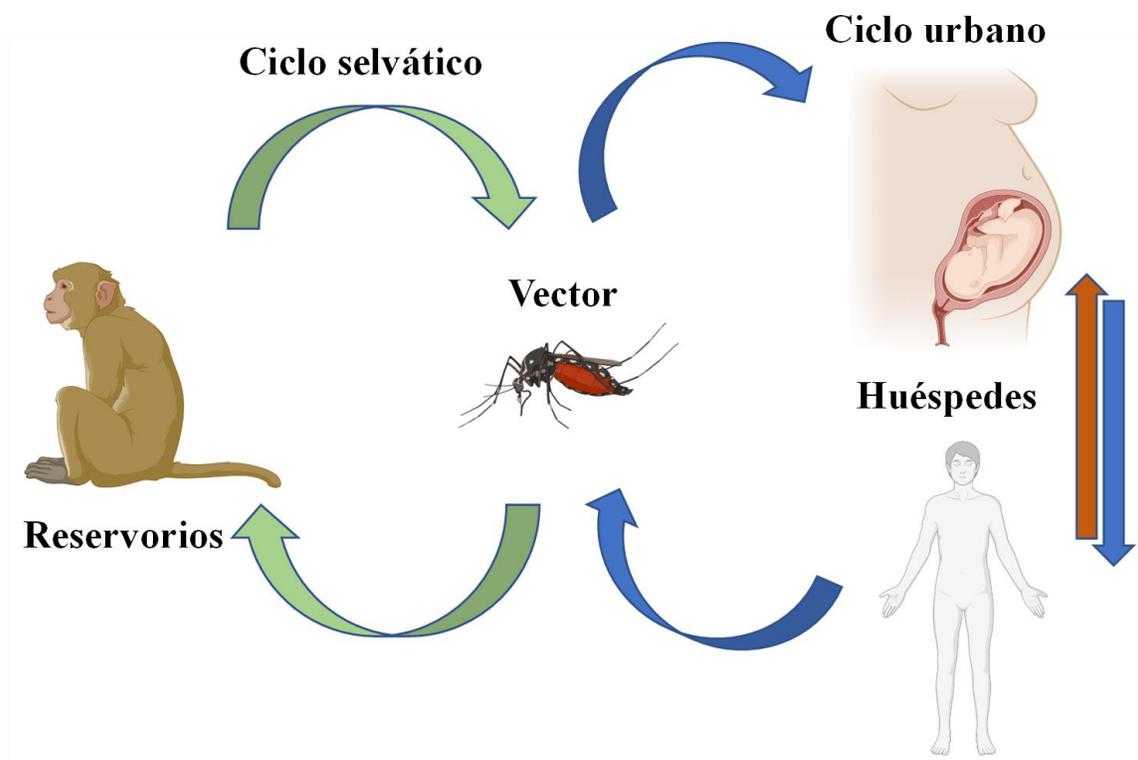


Figura 5. Ciclo zoonótico del ZIKV. Ciclo selvático (flechas verdes) y ciclo urbano (flechas azules). Transmisión humano-humano por diversas vías (flechas naranja y azul).

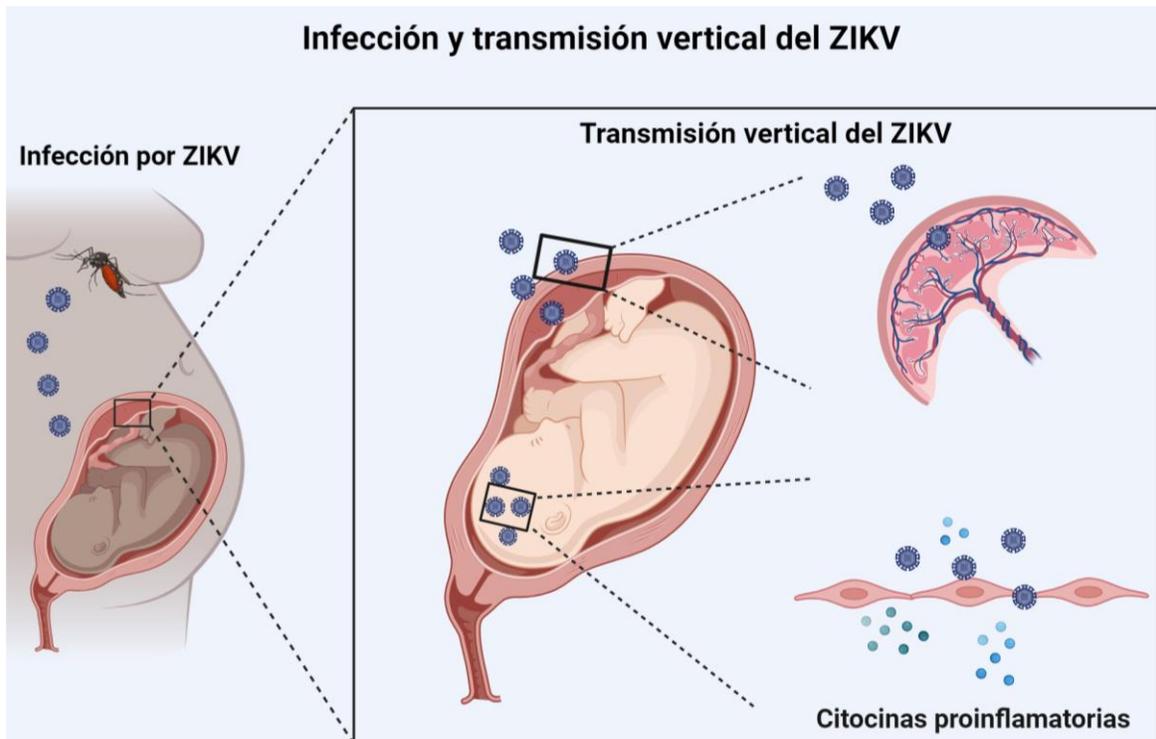


Figura 6. Infección materna y transmisión vertical del ZIKV. La imagen muestra el cruce viral a través de las barreras placentaria y hematoencefálica fetal.

El cuadro clínico correspondiente a una infección por ZIKV es en un 70-80% asintomático, el resto puede presentar signos clínicos clásicos de una infección por *arbovirus* como son: erupciones cutáneas (sarpullidos), dolor de cabeza, mialgia, dolor en las articulaciones, conjuntivitis, náusea, vómito, fiebre y el SGB en adultos, que puede ir desde una parálisis local hasta una total con complicaciones mayores que pueden causar la muerte. Estos son síntomas muy similares a los que se presentan en infecciones por el virus del dengue y el chikungunya, lo que puede llevar a un diagnóstico equivocado de la enfermedad (52, 53).

Efectos neurológicos del Virus del Zika

Se han descrito efectos teratogénicos y neuropatológicos en órganos como los ojos y el cerebro a partir de procesos inflamatorios, neurodegenerativos y autoinmunes causados por la infección del ZIKV. Estos órganos han sido descritos como los principales blancos del virus debido a la alta susceptibilidad a la infección de las poblaciones celulares que los conforman y al neurotropismo que caracteriza a este virus. Esto hace referencia a la capacidad del ZIKV para infectar y replicarse en las células que expresan los receptores específicos de entrada, que en su mayoría se localizan en el SNC (54-56).

La microcefalia asociada a una infección materna por ZIKV es el efecto del cruce del virus a través de la barrera placentaria hasta llegar al SNC fetal, lo que se denomina transmisión vertical (51, 57-59). La microcefalia se manifiesta con un tamaño anormalmente pequeño de la cabeza y el cerebro del feto, el retraso del crecimiento intrauterino grave, las calcificaciones en la placenta y baja proporción de peso placentario-fetal. La infección por ZIKV resulta grave en el primer trimestre del embarazo con probabilidad de muerte fetal, mientras que en etapas posteriores pueden producirse daños irreversibles en el SNC del producto (56, 57, 60, 61).

La cantidad de ZIKV presente en los cerebros fetales *post mortem* es sustancialmente mayor comparada con la reportada en suero de pacientes adultos infectados. Esto evidencia una mayor susceptibilidad al virus en poblaciones celulares cerebrales inmaduras o parcialmente diferenciadas, que en poblaciones ya diferenciadas (46, 62, 63). Se sugiere que esto puede deberse principalmente a

la cantidad de receptores de superficie expresados a los que puede anclarse el ZIKV como: AXL, TYRO 3, DC-SIGN, TIM, TAM, entre otros (64).

La expresión de estos receptores es dependiente del proceso de maduración y diferenciación celular, ya que a mayor madurez hay menor expresión de esos en receptores en las células. No obstante, aún totalmente diferenciadas las células no quedan exentas de una infección por ZIKV (64-66). Las células troncales neurales son sugeridas como la primera población blanco para el virus por su alta expresión del receptor AXL en comparación con otros linajes celulares, lo que puede reducir la viabilidad y proliferación celular normales (64).

Los efectos del ZIKV a nivel celular se caracterizan por una fase citopática, que incluye alteraciones estructurales del citoesqueleto, arresto en el ciclo celular, reducción en la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación de poblaciones celulares, y muerte celular masiva. Esto resulta en un desarrollo deficiente de las estructuras cerebrales en formación (67, 68).

Se sugiere que el ZIKV puede tener una replicación continua durante el neurodesarrollo en las células que conforman el tejido nervioso porque funcionan también como reservorios virales. Esta replicación continua puede durar hasta 28 días a causa de una baja actividad inmunológica fetal característica y una estructura inmadura de la BHE durante el proceso de angiogénesis (69). Como consecuencia, existen daños a nivel celular en los componentes de la BHE y también se pueden apreciar algunos otros daños irreversibles, que incluyen densidad vascular anormal, calcificaciones neuronales y corticales, adelgazamiento del endotelio y alta permeabilidad vascular (60, 61, 63).

Aunque los casos de mayor gravedad se han observado durante el primer trimestre del embarazo, las alteraciones congénitas que se desarrollan de manera posterior, incluso hasta la etapa postnatal, pueden resultar también severas y causar muerte prematura del neonato (**Fig. 7**) (41, 54).

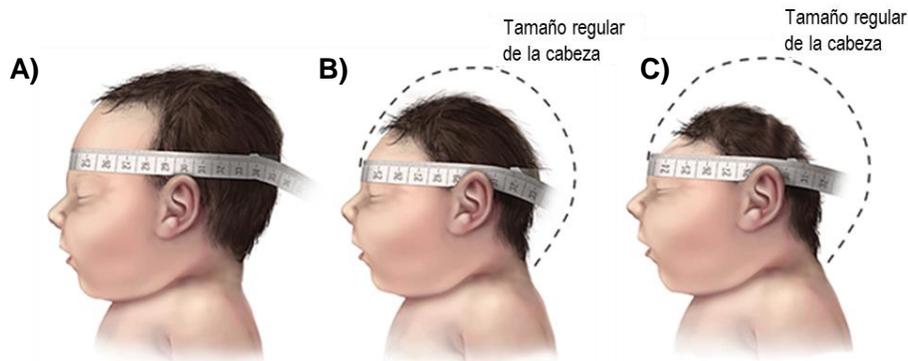


Figura 7. Microcefalia neonatal. Comparación del diámetro de la cabeza **A)** Circunferencia de la cabeza normal. **B)** Microcefalia moderada **C)** Microcefalia grave. Tomada de Centros para control y prevención de enfermedades (CDC) (70).

La primera relación del SGB con el ZIKV se estableció durante el brote viral en la Polinesia Francesa, en el que fue observado un incremento importante de casos con SGB paralelo al número de infecciones por ZIKV (39). Esto también ha podido observarse en países como Brasil, El Salvador y Colombia, lo que sugiere al ZIKV como factor inductor importante a nivel global de esta enfermedad autoinmune (4, 42, 71-73).

El SGB se define como una polirradiculoneuropatía periférica aguda mediada por inmunidad, en muchos casos postinfecciosa ante ciertos patógenos específicos y con manifestaciones clínicas muy variables. Su forma más concurrente se caracteriza por una parálisis flácida muscular limitante debida a un daño en los

nervios periféricos, lo que aumenta la sensibilidad y debilidad simétrica de rápida progresión en las extremidades (74, 75).

En los casos más leves se tiene pérdida gradual del movimiento, flacidez y debilidad muscular, que resulta en una parálisis parcial, reversible con rehabilitación en la mayoría de los casos. La mayoría de los pacientes pierden la capacidad de caminar durante la fase aguda de la enfermedad. Alrededor del 25% de los pacientes requieren ventilación mecánica en cuidados intensivos con el riesgo de parálisis diafragmática y de la pérdida de la función en órganos vitales, causando la muerte (74-76).

En el SGB, las citocinas proinflamatorias se liberan de manera local y sistémica y contribuyen al daño axonal por autoinmunidad, proceso en el que se destruyen los recubrimientos de los nervios periféricos por acción inmunológica contra los epítomos de la mielina de las células de Schwann (**Fig. 8**) (74, 75, 77).

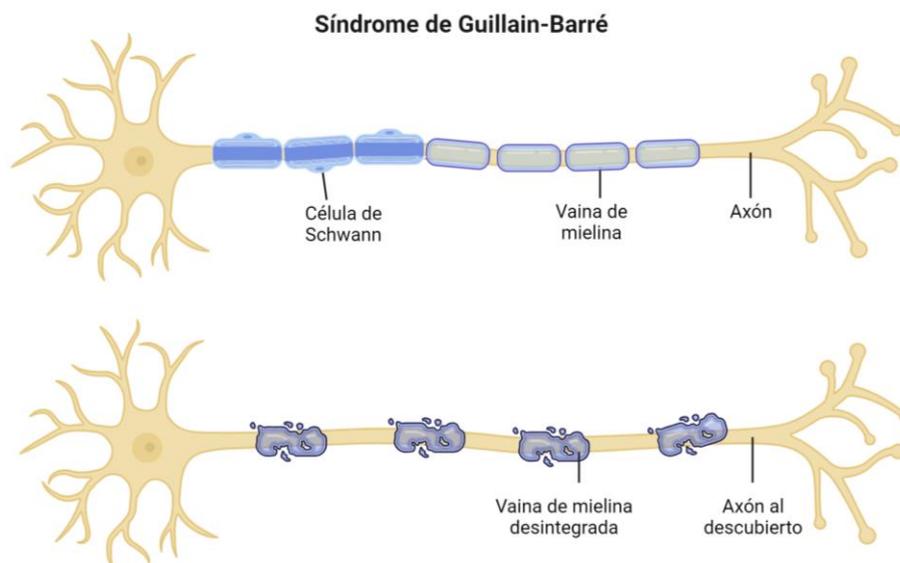


Figura 8. Síndrome de Guillain-Barré. Se observa el daño en las vainas de mielina axonales y exposición de fibras nerviosas.

Esto puede ocurrir por un efecto conocido como mimetismo molecular, que en el caso particular del ZIKV se ha descrito que corresponde a la producción de anticuerpos contra los grupos proteicos ubicados en la región del asa del glicano en la proteína E viral, que asemejan a los epítomos de la mielina en el hospedero, causando su destrucción (**Fig. 9**) (4, 78).

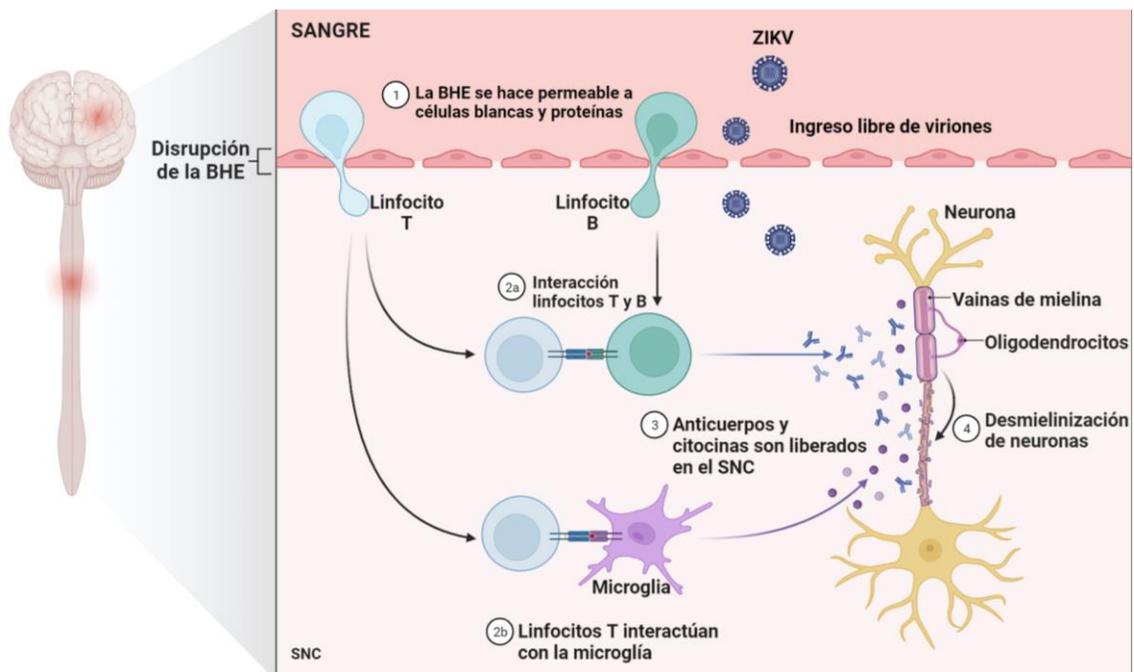


Figura 9. Daño periférico por desmielinización axonal a causa de la liberación de citocinas proinflamatorias y anticuerpos que destruyen la mielina.

El riesgo de presentar el SGB aumenta con la edad y los hombres se ven más afectados que las mujeres; sin embargo, posterior a una infección por ZIKV, el riesgo es inminente en cualquier rango de edad y en ambos sexos (73, 79). La sintomatología que se presenta con el SGB es variable entre los pacientes. En el caso del ZIKV se presenta con mayor frecuencia paraparesia, parálisis facial e insuficiencia respiratoria (80).

Además del SGB y la microcefalia, se han descrito otros padecimientos que, aunque menos frecuentes, también se presentan posteriores a la infección por ZIKV. Estos incluyen la mielitis transversa, encefalitis y la meningoencefalitis, que resultan en la disfunción de las neuronas motoras y pérdida de la motilidad en extremidades superiores e inferiores. Asimismo, también se muestran manifestaciones más severas, incluso en adultos sanos, como edemas corticales, acrecentamientos leptomeníngeos, retención urinaria, paraparesia súbita con progresión a parálisis flácida con signos piramidales e hiperreflexia. De manera general estos padecimientos resumen un daño importante y permanente en el SNC causado por este flavivirus a corto, mediano y largo plazo (4, 73, 81-83).

La Barrera Hematoencefálica

El SNC está protegido por un sistema de barreras fisiológicas, que representan la primera línea de defensa contra patógenos (84). Estas barreras corresponden a la barrera sangre-líquido cerebroespinal, la barrera sangre-aracnoides y la BHE, cuya función es limitar la entrada de agentes extraños al parénquima cerebral, permitir el flujo de iones y agua y ayudar a mantener la homeostasis en el SNC (84, 85).

La BHE es considerada el principal sistema de protección del SNC. Esta se encuentra ubicada en los microvasos vasculares cerebrales y permite la regulación del paso de moléculas entre la sangre y el cerebro por su permeabilidad altamente selectiva (86). Limita también el paso de sustancias como fármacos o xenobióticos y aquellas nocivas como toxinas o patógenos; además provee un microambiente circundante estable, los nutrientes y la composición iónica necesarios para la óptima función neuronal y sináptica (86, 87).

La estructura de la BHE está conformada por células endoteliales altamente especializadas que tienen proteínas transmembranales y accesorias ancladas en su membrana. Estas proteínas se definen como uniones estrechas o tight junctions (TJs) por sus siglas en inglés, que forman puntos de oclusión entre los espacios intercelulares y limitan el acceso de solutos por la vía paracelular. Además, generan y mantienen una alta resistencia transendotelial (TEER) al limitar el paso de iones hacia el parénquima cerebral y permeabilidad selectiva a moléculas provenientes de la sangre (**Fig. 10**) (86-88).

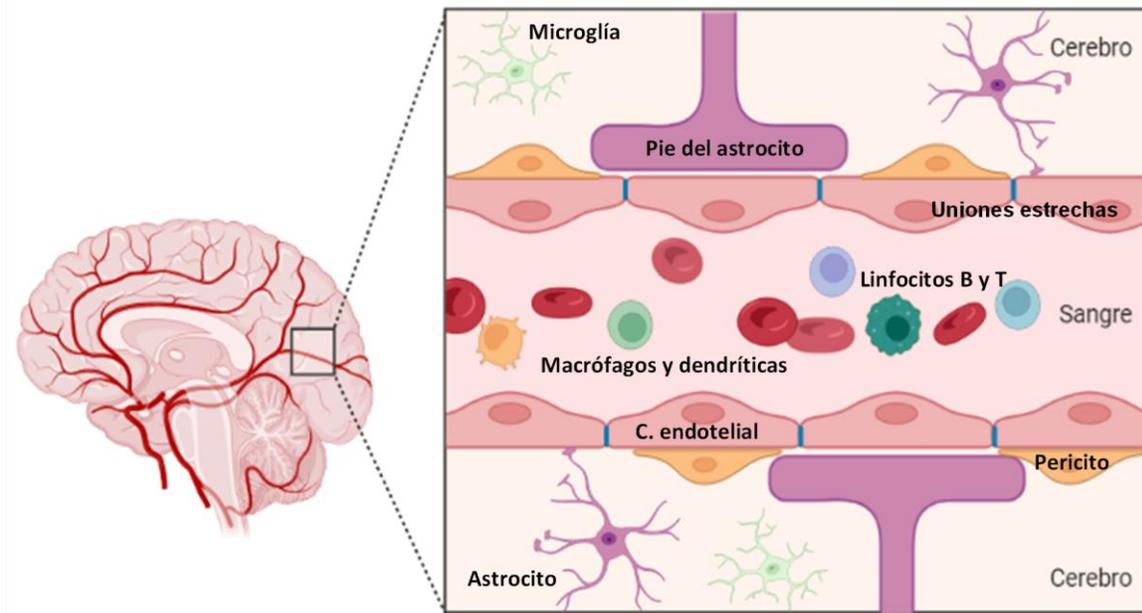


Figura 10. Barrera hematoencefálica (BHE). Principal sistema de protección del SNC.

El SNC es considerado un sitio de regulación ante antígenos extraños controlando la respuesta inflamatoria que estos originan antes de generar un daño. Se encuentra separado de la circulación sanguínea y cuenta con células de defensa (astroglía y microglía), por lo que responde eficientemente a los desafíos infecciosos. A través de las respuestas inmunológicas innatas y humorales, se activan mecanismos de reclutamiento de células de defensa locales y de regulación inflamatoria durante la lesión o infección (89).

La BHE se apoya en otros linajes celulares como los astrocitos, los pericitos, la microglía y las neuronas para su correcto funcionamiento. El conjunto de todos estos grupos de células conforma la unidad neurovascular (UNV), que brinda un sostén estructural y metabólico y enriquece las propiedades de barrera (**Fig. 11**) (86, 90).

Los pericitos son las células de la UNV que recubren la microvasculatura cerebral, lo que los propone como un grupo importante que otorga soporte y protección vitales a las células endoteliales (91). Los astrocitos en conjunto con las células endoteliales mantienen una TEER alta y estable y una baja permeabilidad, además de producir factores proinflamatorios y quimioatrayentes en caso de lesión o infección (92). En conjunto con las células progenitoras neurales y la glía radial, todos estos grupos celulares poseen una influencia directa en el desarrollo e inducción de las propiedades características de la BHE (91, 92)

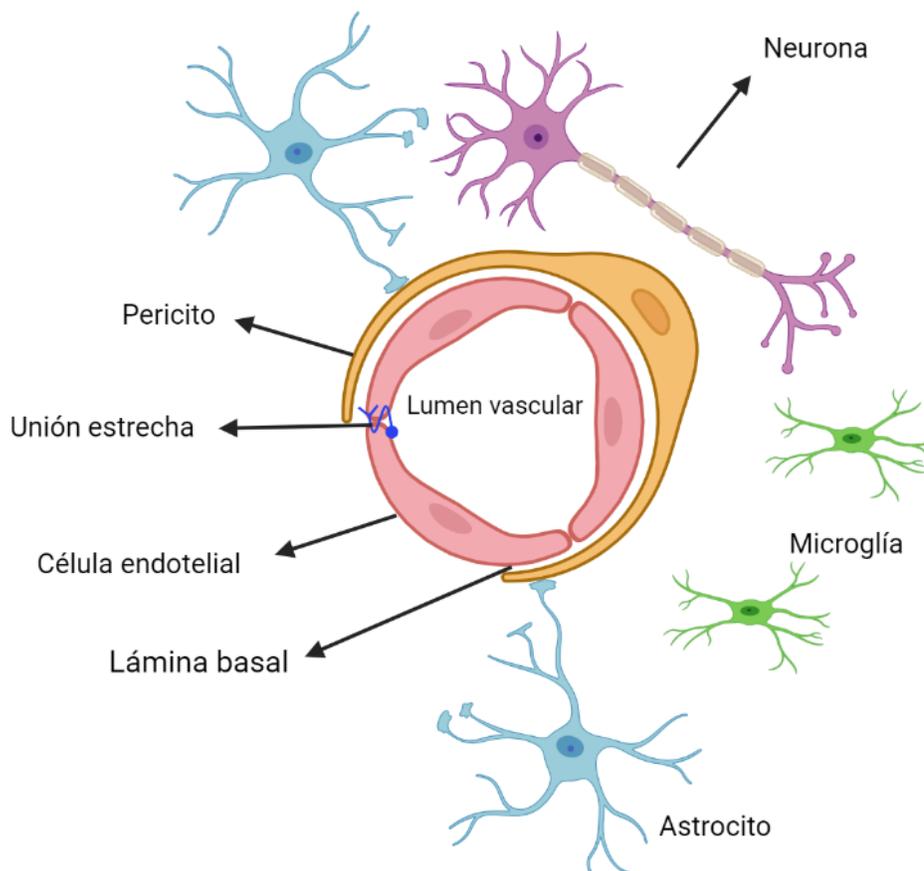


Figura 11. Unidad Neurovascular (UNV) y sus linajes celulares.

La formación de la BHE comienza tempranamente durante el desarrollo fetal con la vascularización, la angiogénesis (formación de los vasos sanguíneos) y la formación del plexo coroideo y continúa aún durante el periodo postnatal (93-95). Las células endoteliales establecidas, regulan la neurogénesis y mantienen la proliferación y viabilidad de las células troncales y progenitoras cerebrales mediante la producción de factores de crecimiento (93-95).

Mientras continúa el desarrollo embrionario, las células que conforman la UNV maduran (principalmente astrocitos y pericitos), como resultado de esto, aumenta la expresión de transportadores de eflujo (como la glicoproteína-P) y disminuye considerablemente el cruce por la vía paracelular debido al cierre gradual de los espacios intercelulares. Esto permite la generación y mantenimiento de las propiedades de barrera que reducen significativamente el paso libre de moléculas como proteínas, nutrientes y iones y la regulación de estas conforme a las necesidades de cada etapa del desarrollo neurológico (88, 91-93, 96).

La oclusión de la vía paracelular por el cierre de los espacios intercelulares se debe a la presencia de las TJs, una red compleja de proteínas transmembranales y accesorias ancladas al citoesqueleto celular endotelial (**Fig. 12**) (97). Estas proteínas son altamente sensibles al microambiente celular circundante, por lo que, ante un cambio en su entorno, pueden inducir modificaciones en la estructura de la BHE (97, 98).

Se ha descrito que las TJs se expresan en los vasos sanguíneos fetales primarios desde la semana 12 de gestación. Esto limita el ingreso de diversas moléculas como la albúmina endógena desde etapas tempranas del desarrollo y

evidencia funcionalidad parcial de la BHE. Aunque en esta etapa la BHE aún no es considerada madura y completamente formada, se ha observado que la expresión de las TJs es parecida a las de BHE adulta a partir de la semana 18 de gestación, lo que brinda una mayor protección ante factores dañinos. No obstante, la BHE continúa siendo vulnerable debido a que continúan los procesos de diferenciación y maduración celulares en el SNC (88, 94, 99, 100).

La estructura de la BHE es considerada totalmente madura hasta el desarrollo post natal. Esta madurez está directamente relacionada con la expresión de las TJs, que genera una TEER alta y hace posible la diferenciación entre los dominios apical y basolateral de las células que les confieren características únicas importantes de barrera en los procesos de regulación, intercambio y selectividad molecular (**Fig. 10**) (86, 97).

Se ha descrito que entre las proteínas que se expresan en la BHE se encuentran las claudinas, la ocludina y *zonula occludens* (ZO), que mantienen un microambiente óptimo para el desarrollo y las funciones neuronales. Entre estos complejos proteicos presentes en el endotelio microvascular cerebral destacan las claudinas, cuya familia se conforma de alrededor de 27 isoformas, pero se ha propuesto que solo las claudinas -1, -3, -5 y -11 son elementos de la BHE (86, 101, 102).

Las claudinas forman estructuras diméricas que se unen a aquellas de células adyacentes para dar origen a los puntos de cierre/unión entre estas. A nivel intracelular se anclan a los dominios PDZ de las proteínas ZO-1, -2 y -3 para

interactuar con los filamentos de actina del citoesqueleto que permiten modificar su estructura ante los estímulos del exterior (86, 97).

En diversos estudios se ha propuesto a la claudina -5 como la proteína más abundante en el endotelio microvascular cerebral (101, 102). Se reconoce su función como un elemento de oclusión en la BHE, por lo que se considera importante en el mantenimiento de la permeabilidad altamente selectiva y de la TEER (102).

Asimismo, también se ha descrito que su expresión se reduce en presencia de patologías dentro del SNC como epilepsia, accidentes cerebrovasculares, Alzheimer, entre otros debido a la pérdida de viabilidad celular causada por el daño, además se ha sugerido que, durante una infección su expresión puede ser modulada por el virus, tal como se ha descrito que ocurre con la claudina-1. Por esta razón se considera un importante marcador de la integridad de la BHE (101-104).

Cabe mencionar que, aunque la claudina -5 ha sido la más estudiada y descrita en los trabajos, se sugiere que no es la única que participa activamente en la homeostasis cerebral. En trabajos recientes, la claudina -3 ha sido propuesta como un elemento presente en la BHE y cuya función está relacionada con el mantenimiento de la permeabilidad selectiva, la TEER y la oclusión de la vía paracelular ante agentes extraños en el SNC (101, 105, 106).

La claudina -3 no ha sido estudiada de manera profunda en la BHE. Sin embargo, hasta este momento, se ha sugerido que puede ser un importante indicador de la disrupción del endotelio vascular cerebral por la pérdida de su

expresión en presencia de procesos inflamatorios en los microvasos, derivados de diversas patologías en el SNC como accidentes cerebrovasculares, glioblastoma multiforme, entre otros (100, 101, 105, 106).

Otros posibles factores que podrían estar relacionados con la pérdida de su expresión son la edad y la alteración en vías de señalización relacionadas como la vía Wnt/ β -catenina, que participa de manera activa en el desarrollo y mantenimiento de la BHE al reducir la permeabilidad paracelular y estimular una mayor expresión de P-gp (101, 105-108).

No obstante, su expresión en la BHE continúa siendo un tema de debate entre los autores debido a que los escasos trabajos realizados limitan su expresión a los plexos coroideos y a los microvasos cerebrales (105, 106, 109).

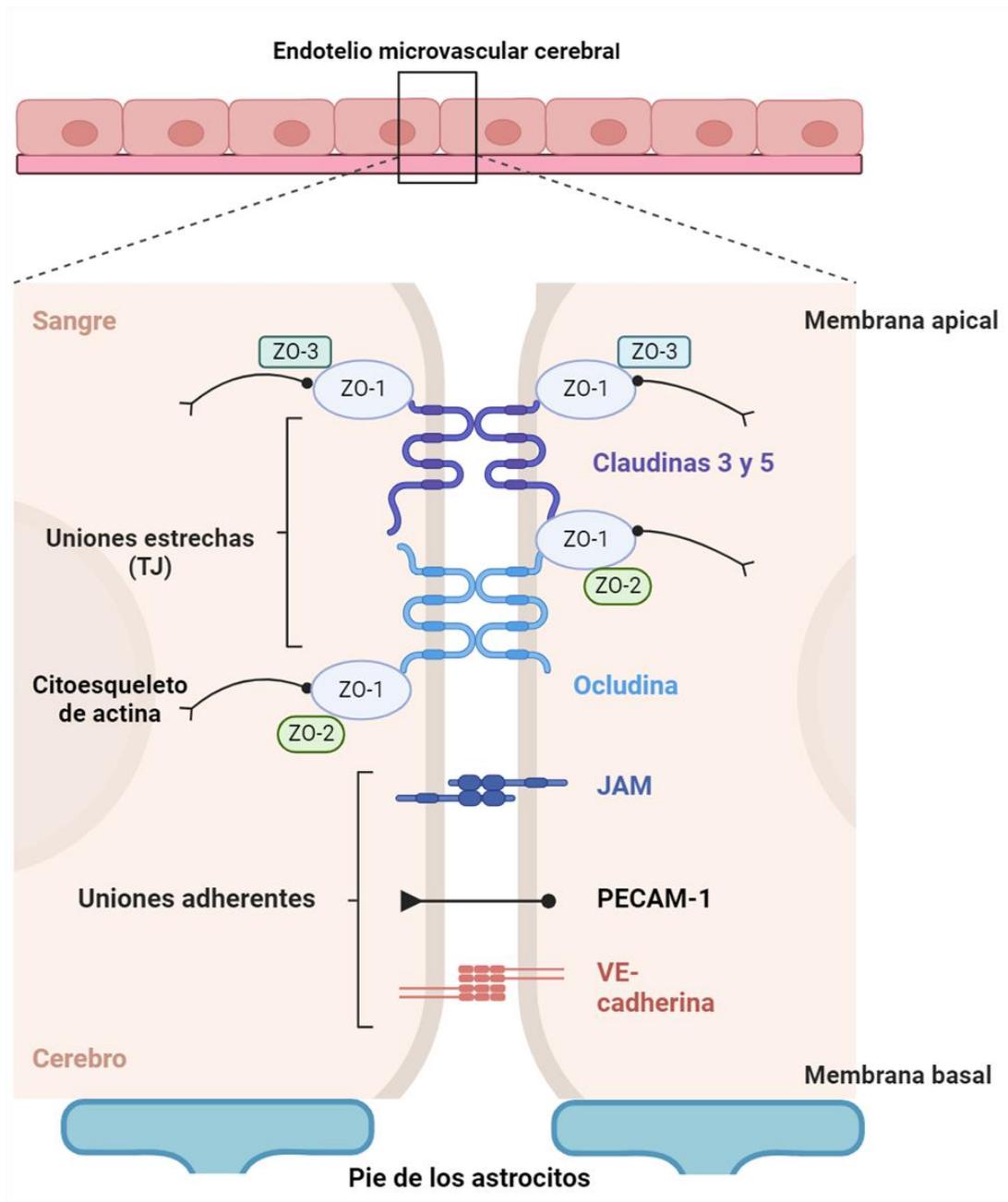


Figura 12. Proteínas de unión estrecha presentes en el endotelio microvascular cerebral. VE-Cadherina (Vascular endotelial cadherin 2), PECAM-1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), JAM (Junctional Adhesion Molecule), ZO-1 (zonula occludens 1), ZO-2 (zonula occludens 2), ZO-3 (zonula occludens 3)

El ZIKV y su ingreso al Sistema Nervioso Central

Los *flavivirus* han desarrollado adaptaciones más especializadas para acceder e invadir el SNC y el Sistema Nervioso Periférico (SNP). Las principales vías de entrada por el SNP son el transporte axonal retrógrado o por el bulbo olfatorio, mientras que en el SNC pueden llegar a las barreras de protección y cruzarlas por vía hematológica (110, 111). Se destacan dos vías por las cuales estos virus pueden cruzar el endotelio cerebral: la transcelular, directamente a través de la célula y la paracelular, que involucra a las TJs entre las células adyacentes (**Fig. 13 y 14**) (110, 112, 113).

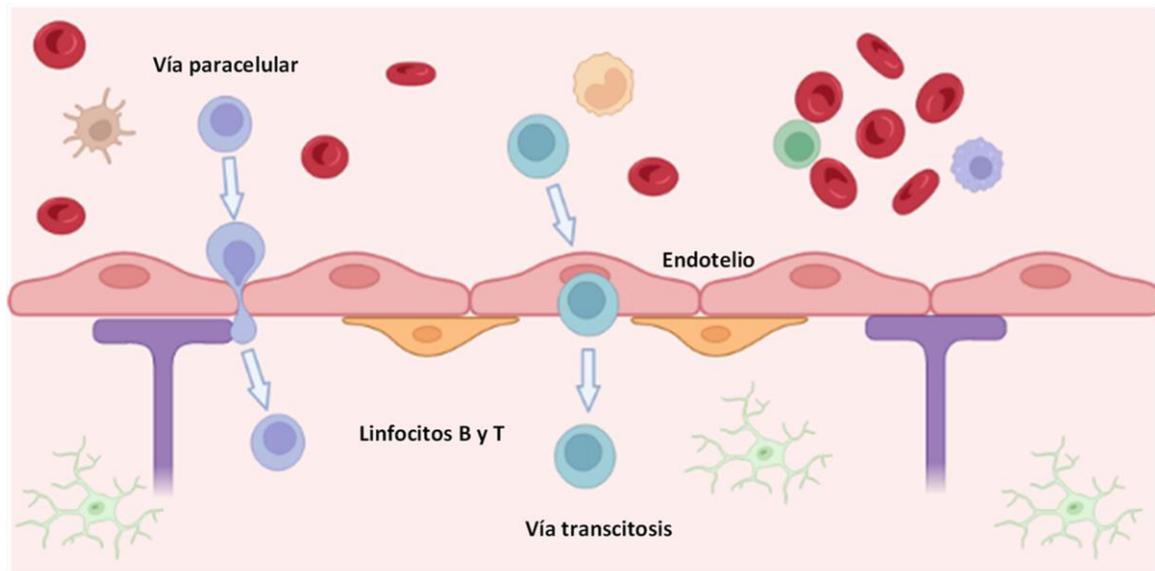


Figura 13. Mecanismos de cruce celular en la BHE. En la imagen se observa el cruce de linfocitos por la vía paracelular, que corresponde al paso entre los espacios intercelulares hacia el parénquima cerebral y por la vía transcelular que ocurre de manera directa a través de la célula.

Ambas vías poseen una actividad regulada en la BHE en un estado fisiológico donde existe una alta TEER y una reducida actividad pinocítica. Sin embargo, se ha descrito que ambas vías pueden modificar su actividad en respuesta a los procesos inflamatorios derivados de una infección e incrementar el acceso viral (110, 112, 113).

El ZIKV es considerado un virus neurotrópico, neuroinvasivo y neurovirulento ya que puede infectar el tejido nervioso al cruzar las barreras de protección del SNC (114, 115). En algunos trabajos se ha propuesto que el ZIKV utiliza la vía transcelular para acceder al SNC durante la infección, razón por la cual se ha considerado que no causa una disrupción en las uniones estrechas que modulan la vía paracelular (116-118).

Particularmente, el ingreso del ZIKV comienza tras la inoculación del virus en los fibroblastos dérmicos a través de la picadura del mosquito (119). Posteriormente, el virus se disemina en el torrente sanguíneo infectando a las células inmunológicas, como macrófagos y células dendríticas. Estas células infectadas pueden cruzar de manera directa hacia los nódulos linfáticos o las terminaciones nerviosas que llevan hacia el SNC, llevando la infección viral de forma sistémica hacia las barreras de protección del cerebro (120).

Cuando el ZIKV cruza la BHE, entra en acción un sistema de defensa inmunológica local que involucra a la microglía, la cual participa en la producción de factores proinflamatorios como citocinas y quimiocinas. Estas citocinas generan una respuesta de activación en los astrocitos, las células endoteliales y los fibroblastos (**Fig. 14**) (121, 122). La producción de estos factores proinflamatorios en conjunto

incrementa la respuesta defensiva y moduladora de la inflamación y atrae más células de defensa al sitio afectado. No obstante, al ser producidas de manera exacerbada, promueven un daño más grave en el SNC (122-126).

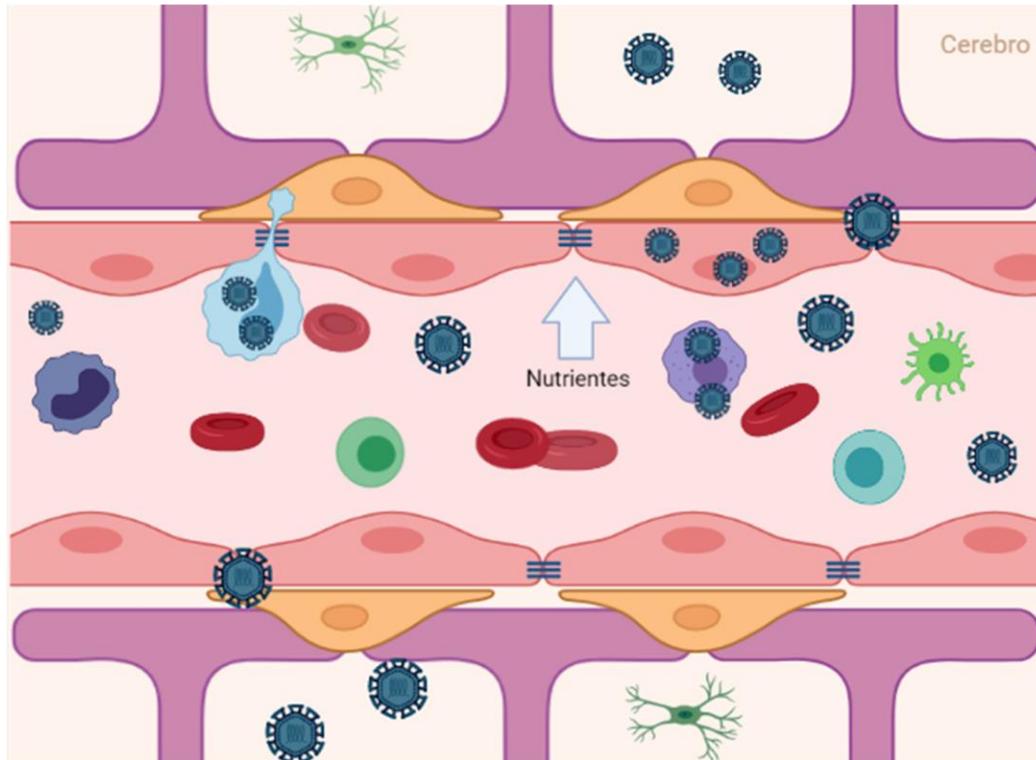


Figura 14. Diseminación del ZIKV hacia el parénquima cerebral. Cruce por el mecanismo conocido como “caballo de Troya” mediante células inmunológicas infectadas (monocitos, macrófagos, linfocitos y dendríticas).

El estímulo inflamatorio derivado de la infección viral también genera mayor expresión de moléculas de adhesión en el endotelio para facilitar el cruce de células de defensa sistémicas vía diapédesis. Sin embargo, este mecanismo conocido como "caballo de Troya" permitiría también el cruce de las células inmunológicas infectadas a través de la BHE (**Fig. 15**) (120, 127).

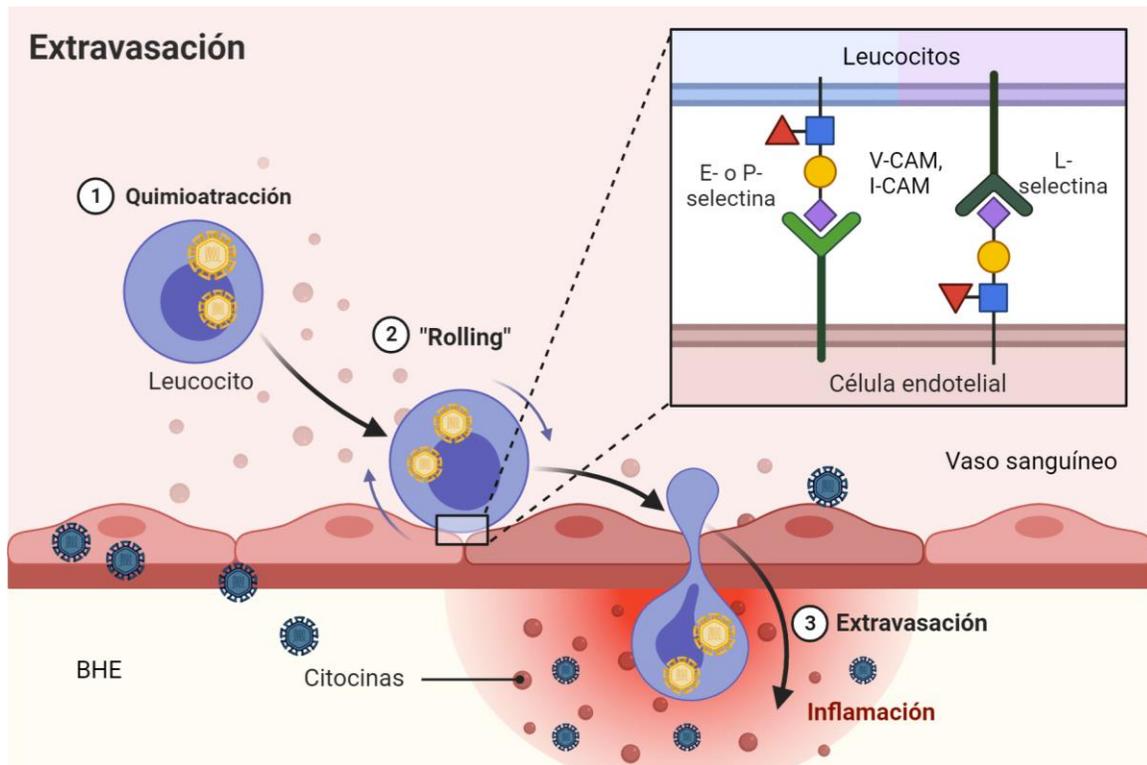


Figura.15. Diapédesis celular. Migración de células blancas a través del parénquima cerebral por incremento de proteínas adherentes como V-CAM, I-CAM y L-selectina.

Las citocinas proinflamatorias producidas durante la infección por ZIKV pueden contribuir al daño en el SNC. Se ha descrito su participación en el deterioro vascular fetal, que se caracteriza por un número reducido y formas irregulares de los capilares en formación, insuficiencia placentaria, restricción en el crecimiento intrauterino y alteración en la diferenciación de células neurales progenitoras que originan los linajes neuronales y gliales (astrocitos y oligodendrocitos). De la misma manera, promueven la diseminación del virus al estimular la migración de macrófagos placentarios infectados que mantendrían activa la infección (122-124, 128, 129).

Efecto interplay viral

Durante el desarrollo de una infección, existen diversas interacciones entre los virus y sus hospederos. Los virus han desarrollado mecanismos para acceder a las células o propagarse a través de los tejidos en un hospedero. Esto ocurre con el fin de asegurar la subsistencia y continuidad de la progenie viral, a través de la producción de proteínas esenciales para su replicación y ensamblaje (130).

La infección y la diseminación viral dentro de un hospedero están limitadas por las células epiteliales, que recubren las superficies de los órganos y tejidos para formar una barrera física reforzada por uniones estrechas. Por lo tanto, la interrupción de las uniones estrechas en las barreras epiteliales y endoteliales facilita la diseminación dentro del hospedero infectado. Varios virus modulan la expresión de proteínas de las TJs, como las claudinas para mejorar su diseminación (131). Por otro lado, los hospederos también han desarrollado mecanismos de defensa ante estas invasiones virales, principalmente a través de la producción de elementos que interfieren con los procesos de replicación viral (130).

La interacción entre estos mecanismos se conoce como efecto interplay. Este efecto ha sido descrito con diversos virus como el de la Hepatitis C, Epstein-Barr, Citomegalovirus, entre otros (132-134). En este proceso, se involucran las respuestas inmunológicas, innata y adaptativa, del hospedero contra el agente infeccioso y las virales, que pueden inducir alteraciones en la expresión de moléculas como proteínas y lípidos que facilitan su ingreso a la célula, la evasión de la respuesta inmune y la continuidad del ciclo de replicación. Cabe mencionar que, estos efectos son dependientes del ciclo replicativo de cada virus y de los

procesos patológicos inflamatorios que desencadenan a nivel sistémico o local (130, 135, 136).

En la BHE, las claudinas modifican su expresión durante una infección viral y son los componentes más afectados de las TJs (131, 137, 138). Se ha descrito que, la expresión de las claudinas -1 y -5 en diversos epitelios y endotelios se reduce por la infección por *flavivirus* como el virus del Nilo Occidental, hepatitis C, dengue y *retrovirus* como el HIV, facilitando la entrada a las células y controlando su eficiencia replicativa (139).

En general, la expresión de la claudina -3 ha sido poco estudiada. Por ejemplo, se ha descrito que en el epitelio tubular de los riñones ante la infección por el virus Nilo Occidental, la expresión de esta proteína está reducida (131).

Es importante destacar que, hasta este momento, no ha sido descrita la expresión de la claudina -3 ante una infección por ZIKV en las células endoteliales del cerebro. Por este motivo, se decidió evaluar la expresión de esta proteína en un sistema de infección in vitro en células HBEC-5i infectadas con ZIKV.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la expresión de la claudina -3 en cultivos de células endoteliales de la microvasculatura de cerebro de humano (HBEC-5i) expuestos a diferentes multiplicidades de infección (MOI) de ZIKV MR-766 a diferentes tiempos.

Objetivos particulares

1. Establecer el título viral de la cepa MR-766 de ZIKV.
2. Evaluar la expresión de la claudina -3 en los cultivos de células endoteliales cerebrales humanas (HBEC-5i) expuestos a la cepa MR-766 de ZIKV a diferentes MOI (0.1, 1, y 10) y tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por inmunofluorescencia indirecta (IFI).
3. Evaluar la expresión de la claudina -3 en los cultivos de células endoteliales cerebrales humanas (HBEC-5i) inoculados con la cepa MR-766 de ZIKV a diferentes MOI (0.1, 1, y 10) y tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por citometría de flujo.

ANTECEDENTES

En condiciones fisiológicas el acceso de agentes extraños hacia el parénquima cerebral es restringido por la oclusión intercelular de las proteínas de las TJs (claudinas, ocludina y *zonula occludens*). En este complejo proteico se destaca a las claudinas, cuya función se relaciona con el mantenimiento de la homeostasis celular y la permeabilidad altamente selectiva. No obstante, el ZIKV es capaz de cruzar e infectar los linajes celulares neurales, causando daños importantes en el SNC relacionados con una disrupción en la integridad de la BHE (112, 123, 140, 141).

En estudios recientes, Chiu *et al.* (2020) sugieren que no se presentan alteraciones significativas en la expresión de las TJs, ni en la permeabilidad del endotelio en células endoteliales capilares de cerebro humano (hCMEC/D3) infectadas por el ZIKV, por lo que no consideran que la infección viral sea un factor de disrupción de la BHE (112).

De manera similar, Papa *et al.* (2017) evaluaron la integridad de la BHE con dos modelos, uno *in vitro* con células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (HBMECs) y otro *in vivo* con ratones. Ambos fueron infectados con dos cepas de ZIKV: MR-766 y PE243. Los autores concluyeron que aunque ambas cepas cruzaron e infectaron el endotelio de la BHE, ninguna causó modificaciones significativas en la permeabilidad, por lo que llegaron a la misma conclusión que el trabajo previamente descrito (117).

Alimonti *et al.* (2018) establecen que el ZIKV no es un factor que cause disrupción en la BHE, coincidiendo también con los dos trabajos anteriores, donde

se obtuvo una infección exitosa de las células endoteliales cerebrales sin comprometer la integridad y permeabilidad de la BHE (118).

De manera contraria, otros autores han establecido que la infección por el ZIKV sí modifica la integridad de la BHE. En el estudio de Leda, *et al.* (2019) se destacó un decremento en la expresión de claudina -5 y una sobre expresión de ocludina y ZO-1 en las células endoteliales microvasculares cerebrales (BMECs) infectadas con 3 cepas de ZIKV: Honduras (ZIKV-H), Puerto Rico (ZIKV-PR) y Uganda (ZIKV-U). Concluyendo que la infección sí afecta la expresión de las TJs en la BHE (116).

Estos resultados coinciden con los de Clé *et al.* (2020), donde se observó una reducción en la expresión de las TJs en células endoteliales cerebrales humanas como consecuencia de la infección por ZIKV (142).

En esos trabajos se destaca que, la claudina -5 es la proteína más estudiada en la BHE en presencia del ZIKV. No obstante, la presencia de la claudina -3 en el endotelio de la BHE ha sido motivo de debate entre varios autores, quienes sugieren que esta claudina puede tener un papel igual de importante que la -5 en las funciones de mantenimiento de la permeabilidad selectiva y la homeostasis celular (105, 106).

Berndt *et al.* (2018) determinaron que la expresión de las proteínas de las TJs en células endoteliales de humano y ratón se reducen en presencia de diversas patologías en el SNC. Asimismo, enfatizan en su trabajo que la claudina -3 puede ser un importante indicador de la integridad de la BHE, ya que relacionan la pérdida de su expresión con un estado patológico inflamatorio en el SNC (101).

Esto coincide con lo reportado por Schrade *et al.* (2012), donde se evaluó la presencia de las claudinas -3 y -12 en células endoteliales microvasculares humanas (hCMEC/D3). Los autores concluyeron que la claudina -3 sí está presente en los espacios intercelulares del endotelio y destacan que su expresión puede reducirse de manera significativa por la presencia de inflamación en los microvasos cerebrales. Por esta razón, ellos proponen a la claudina -3 como un marcador potencial de la integridad de la BHE y un indicador del estado patológico en el SNC (105).

Wolfburg *et al.* (2003) demostraron que la claudina -3 se expresa en condiciones fisiológicas en los microvasos cerebrales de ratón y humano. No obstante, observaron decrementos significativos en su expresión en presencia de inflamación circundante derivado de un estado patológico en el SNC, no así con otras TJs, cuya expresión no presentó cambios significativos bajo estas mismas condiciones, por lo que los autores proponen que la claudina -3 es un elemento de gran importancia en la BHE y que al verse modificada se puede ver comprometida la integridad de la BHE (106).

Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó la expresión de la claudina -3 en células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) inoculadas con MOI de 0.1, 1.0 y 10 de ZIKV MR-766 a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

METODOLOGÍA

Obtención del título viral de ZIKV por TCID 50

Para establecer el título viral en este trabajo, se utilizó la línea celular A549 (ATCC-Manassas, VA, USA # Cat. CCL-185) por su origen humano y alta susceptibilidad a la infección por ZIKV.

Los cultivos de A549 se realizaron en placas de 96 pozos y se mantuvieron en condiciones estándar (5% CO₂ y 37°C) con medio MEM (Gibco by Thermo Fisher®, Gran Island NY, USA # Cat. 11095080) adicionado con SFB 5% (Gibco by Thermo Fisher®, Gran Island NY, USA # Cat.15575309). Cuando las células alcanzaron una confluencia alrededor del 80% se inocularon con diluciones de ZIKV MR-766 (ATCC Co.,-Manassas, VA, USA # Cat. VR-84) preservado en nitrógeno líquido, con un título viral inicial de 1.6×10^7 TCID₅₀ por mililitro.

Las diluciones de ZIKV MR-766 se realizaron desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁴. Posteriormente, se realizó un registro fotográfico de la exposición diariamente durante 5 días (120 h) para observar el efecto citopático (CPE), que corresponde al cambio morfológico que sufren las células por efecto del virus y que se manifiesta por la presencia de sincicios (estructuras formadas por la unión de varias células) y vacuolizaciones citoplásmicas.

Al completarse el tiempo, se realizó una inmunocitoquímica con un anticuerpo primario monoclonal contra la proteína de envoltura E del ZIKV (Invitrogen, Zika virus E envelope protein domain III recombinant rabbit monoclonal antibody # Cat. MA5-36038) contrastado de manera secundaria con

aminoetilcarbazol para evidenciar los focos de infección. Se cuantificaron los focos de infección y se calculó la TCID₅₀ por el método de **Spearman-Kärber** (143) con la siguiente fórmula:

Log ID₅₀ = Log (Dilución más alta con 100% CPE) + 0.5 - # total de unidades experimentales mostrando CPE / # de unidades experimentales por dilución

Donde:

- **Dilución más alta con el 100% de CPE** equivale a la máxima dilución del virus con la que se presenta el 100% de CPE.
- **0.5** es una constante.
- **# total de unidades experimentales mostrando CPE** equivale al número de pozos totales que presentan CPE visible.
- **# de unidades experimentales por dilución** equivale al número de pozos por cada dilución utilizada.

Cultivo de fibroblastos (HFF) e inoculación con ZIKV MR-766

Para el establecimiento de las diluciones óptimas de anticuerpos primario y secundario para detectar claudina -3 en la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos (HFF) a partir de tejido de prepucio humano. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar (5% CO₂ y 37°C) con medio de cultivo MEM (Gibco), suplementado con 10% de SFB (Gibco) hasta alcanzar una confluencia entre el 70-80%. Posteriormente se inocularon con

MOI de ZIKV MR-766 de 0.1, 1.0 y 10 a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h, respectivamente).

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Para la determinación de las diluciones más adecuadas de los anticuerpos para la técnica de inmunofluorescencia, las células se fijaron en las placas de cultivo con metanol absoluto líquido frío durante 5 minutos; posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X para eliminar el exceso de fijador. Cabe mencionar que entre cada paso se realizaron estos mismos lavados para retirar el exceso de los reactivos utilizados.

Las células se incubaron con BSA 5% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 5 min para el bloqueo de sitios inespecíficos. A continuación, se colocaron en los cultivos celulares las diluciones 1:100, 1:150, 1:200 y 1:250 del anticuerpo primario para claudina -3 policlonal de conejo (Invitrogen, San Diego, CA, USA #Cat PA5-16867) y se dejaron incubar por 24 horas a 4°C. Al concluir el tiempo de incubación, se colocó el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 cabra anti-conejo (Invitrogen #Cat ab150077) con las mismas diluciones del primario y se dejó durante aproximadamente 3 horas a 4°C.

Finalmente, se adicionaron 5µl de yoduro de propidio (Sigma Aldrich, Co. #Cat. P4170-250MG) a una concentración de 1µg/µl antes de realizar el montaje, únicamente con el fin de contrastar los núcleos celulares. Posteriormente se observaron al microscopio confocal modelo Axiovert 100M LSM 510 (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes fueron procesadas con el software ZEN 2010.

Cultivos de células endoteliales de cerebro humano (HBEC-5i) e inoculación con el ZIKV

Para establecer el monocultivo con la línea celular endotelial cerebral microvascular humana (HBEC-5i, ATCC # Cat. CRL-3245-ATCC) las células se mantuvieron en condiciones estándar con medio DMEM-F12 (Gibco # Cat. 11320033) suplementado con SFB al 10% (Gibco) y factor de crecimiento endotelial (ECGF) (Sigma Aldrich, # Cat. E2759-15MG) a una concentración de 50 µg/ml. Cuando se alcanzó una confluencia entre el 70-80% los cultivos se tripsinizaron y se distribuyeron en placas de 24 pozos cubiertas con cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma Aldrich # Cat. P4707). Posteriormente, las placas fueron incubadas hasta tener una confluencia entre el 70-80%, se infectaron con ZIKV a 0.1, 1.0 y 10 MOI y se dejaron durante los tiempos establecidos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

Expresión de claudina -3 por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Para determinar la expresión de la claudina -3 por fluorescencia, se realizó la fijación de las células HBEC-5i en las placas de cultivo, con metanol líquido absoluto frío por 5 minutos y se continuó con la técnica de inmunofluorescencia previamente descrita. Una vez concluido el tiempo de exposición, se utilizó un anticuerpo policlonal para claudina -3 (Invitrogen) y un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 para evidenciar la expresión de esta proteína. Para el marcaje de los núcleos se utilizó también yoduro de propidio (Sigma Aldrich) a una concentración de 1 µg/µl previo al montaje. Las laminillas se observaron en un microscopio confocal modelo

Axiovert 100M LSM 510 (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes fueron procesadas con el software ZEN 2010.

Expresión de claudina -3 por citometría de flujo

Para determinar la expresión de claudina -3 por citometría de flujo, los cultivos fueron distribuidos también en placas de 24 pozos hasta formar una monocapa. Una vez establecida, las células fueron despegadas con un cell scraper, se disgregaron mecánicamente con una jeringa de 3ml con medio de cultivo hasta su distribución individual y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se eliminó el medio, se realizaron lavados con PBS 1X durante 5 minutos cada uno y se añadió paraformaldehído al 1% como fijador, se resuspendió el paquete celular durante 5 minutos aproximadamente y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se retiró el paraformaldehído y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X para remover el exceso, se añadió el anticuerpo primario para claudina -3 y se resuspendió el paquete celular, dejando en incubación durante 24h a 4°C. Al concluir este tiempo, se realizaron nuevamente lavados con PBS 1X, se añadió el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 y se dejó incubar durante aproximadamente 3 horas junto con el yoduro de propidio a una concentración de 1µg/µl y se centrifugaron bajo las condiciones previamente mencionadas. Se les retiró el anticuerpo, se añadió PBS 1X y se resuspendieron disgregando nuevamente los agregados celulares. Finalmente, la muestra se colocó en tubos para citómetro a 4°C en completa oscuridad y se realizó la lectura correspondiente

de los 5,000 eventos considerados. Se utilizó un citómetro de la marca Becton Dickinson (BD Biosciences, CA, USA,) y se analizó con el software FACSCanto II.

En el análisis se consideraron el tamaño y la granularidad para caracterizar a la línea celular HBEC-5i, la cual se observó como una población uniforme de tamaño pequeño (observado por el desplazamiento hacia la izquierda en la gráfica dotplot) y poca granularidad (**Ver anexo V**)

Expresión de claudina -3 en unidades de fluorescencia (píxeles)

Las imágenes de la IFI se utilizaron para cuantificar la expresión de claudina -3 por fluorescencia en unidades de fluorescencia (píxeles) con el programa de Image J y se realizaron gráficas representativas con el programa Microsoft Office 365 Excel.

Expresión de claudina -3 en % de Gates por citometría de flujo

La expresión de claudina -3 en las células HBEC-5i se determinó considerando la lectura de 5000 eventos por cada muestra en un citómetro de flujo (BD Biosciences) y se realizó el análisis de los datos obtenidos en los dotplots e histogramas. A partir de los resultados, se realizó una compensación en los dotplots obtenidos considerando una división por Gates, esto nos permitió excluir aquellas células fuera de los rangos establecidos y considerar una medición más homogénea.

Expresión de claudina -3 en Intensidad Media de Fluorescencia (MIF) por citometría de flujo

También se cuantificó la expresión de claudina -3 en las células HBEC-5i considerando la media de la fluorescencia de todas aquellas células que presentaron esta emisión en cada muestra.

Análisis estadístico

De manera inicial, para conocer la normalidad de los datos se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnoff con el programa Stats. Para evaluar nuestros datos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba *post hoc* de Dunnett, considerando una $n=3$ para cada experimento. Los datos estuvieron representados como la media \pm EE y una $*p<0.01$ y $**p<0.001$. Para determinar las posibles diferencias entre las dos subpoblaciones celulares encontradas de HBEC-5i (SP1 y SP2) según su expresión de claudina -3, se realizó una prueba t de Student. Los análisis de datos se analizaron con el programa inerSTAT-a v2.1 beta desarrollado por el Dr. Mario H. Vargas y la elaboración de gráficas con Microsoft 365 Excel y Power Point.

RESULTADOS

Obtención del título viral por TCID₅₀ en células A549

Cuando los cultivos de células A549 (ATCC-Manassas, VA, USA # Cat. CCL-185) alcanzaron una confluencia ~80% y se inocularon con la cepa de ZIKV MR-766 (ATCC-Manassas, VA, USA # Cat. VR-84) con diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-14} , se observó durante los 5 días (120 h) post exposición una ruptura en la monocapa en presencia del ZIKV, un CPE marcado además de la formación de múltiples sincicios, que son estructuras formadas a partir de la fusión de varias células que se da de manera frecuente en infecciones virales (**Fig.16**).

La formación de focos de infección como consecuencia de la inoculación con el ZIKV se evidenció con la tinción del anticuerpo contra la proteína de envoltura (anti-E) del virus (Invitrogen, Zika virus E envelope protein rabbit monoclonal antibody) con aminoetilcarbazol (**Fig. 17**). Estos focos infecciosos fueron contabilizados y se calculó la **TCID₅₀** por el método de **Spearman-Kärber**, que se estableció en $10^{6.33}$. Con este dato se corroboró que el título viral proporcionado por el proveedor de 10^7 TCID₅₀/ml corresponde al título viral requerido en los experimentos.

Cultivos primarios de fibroblastos (HFF) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las diluciones óptimas de los anticuerpos primario y secundario contra claudina -3 fueron de 1:250 para el anticuerpo primario y 1:200 para el secundario con base en la nitidez y el menor fondo observados en las imágenes (**Ver Anexo I**).



Figura 16. Efecto citopático (CPE) en células A549 infectadas con el ZIKV MR-766 a las 24 h con un título viral de 10.6×10^7 . Formación de sincicios (señalados con flechas). Aumento 100X.

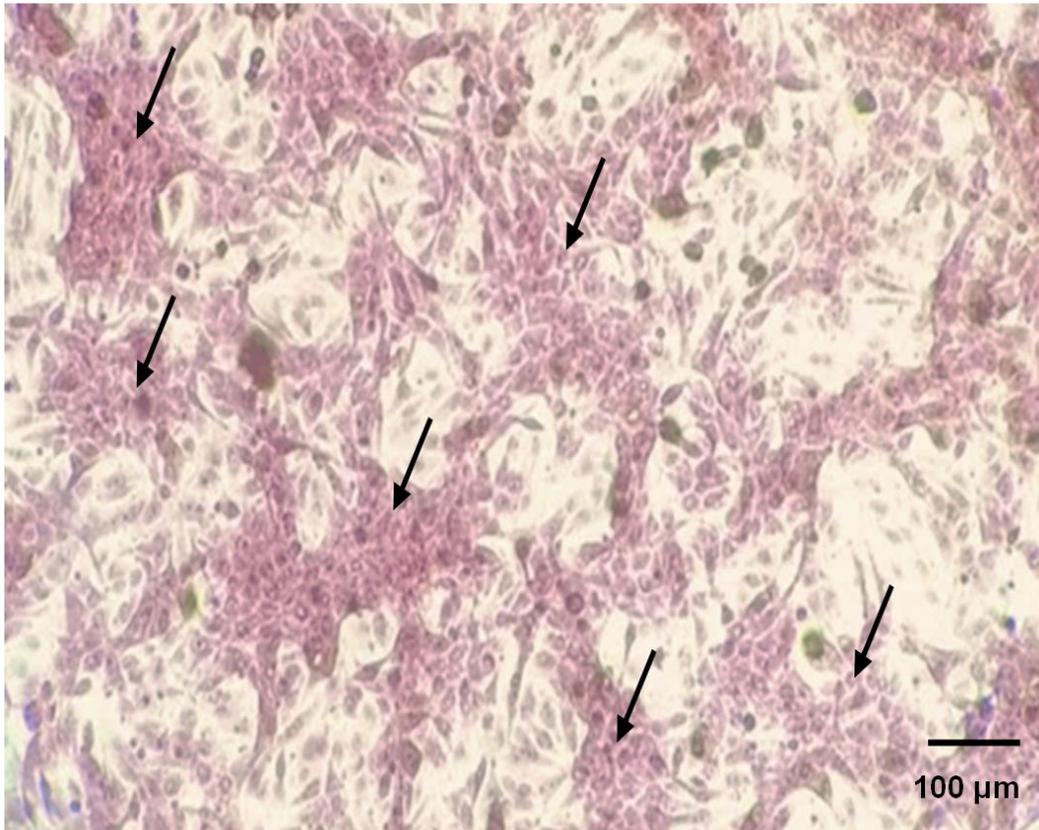


Figura 17. Focos de infección formados en células A549 infectadas con el ZIKV MR-766 a las 24 h con una dilución de 10^{-10} . Se evidencia la presencia de la proteína de envoltura (E) del ZIKV con la técnica de inmunocitoquímica utilizando aminoetilcarbazol, (focos señalados con flechas). Aumento 40X.

Cultivos de células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (HBEC-5i) e inoculación con ZIKV

Una vez establecidos los cultivos de células HBEC-5i en placas de 24 pozos, se dejaron crecer hasta la formación de una monocapa. Una vez confluentes, se inocularon con las distintas multiplicidades de infección (MOI) de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) a partir del título viral obtenido a los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) (**Fig. 18 y 19**).

Se observó la ruptura de la monocapa de células en presencia del ZIKV MR-766 y un CPE visible con formación de múltiples sincicios en las primeras 24 h posteriores a la inoculación con ZIKV (**Fig. 20**).

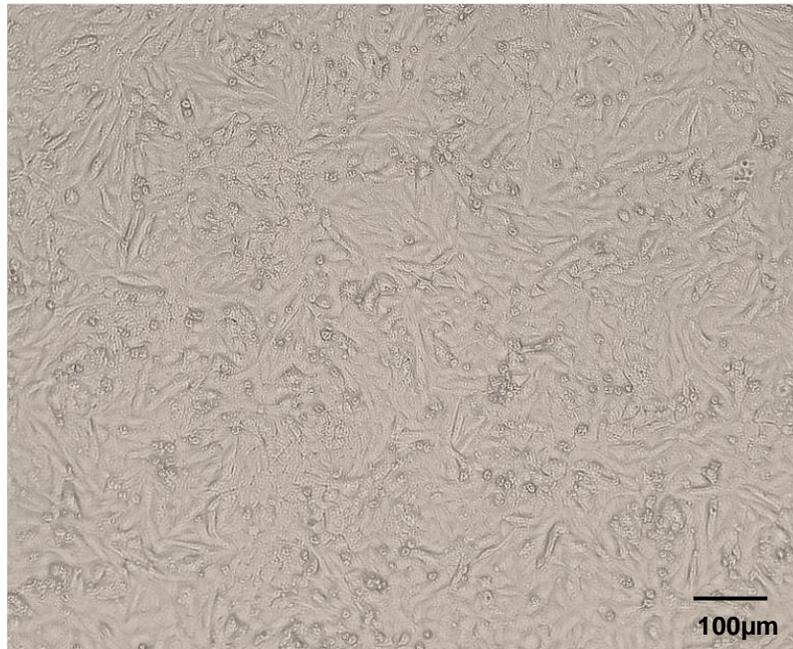


Figura 18. Cultivo de células endoteliales cerebrales humanas (HBEC-5i) en monocapa confluyente sin exposición al ZIKV. 100X.

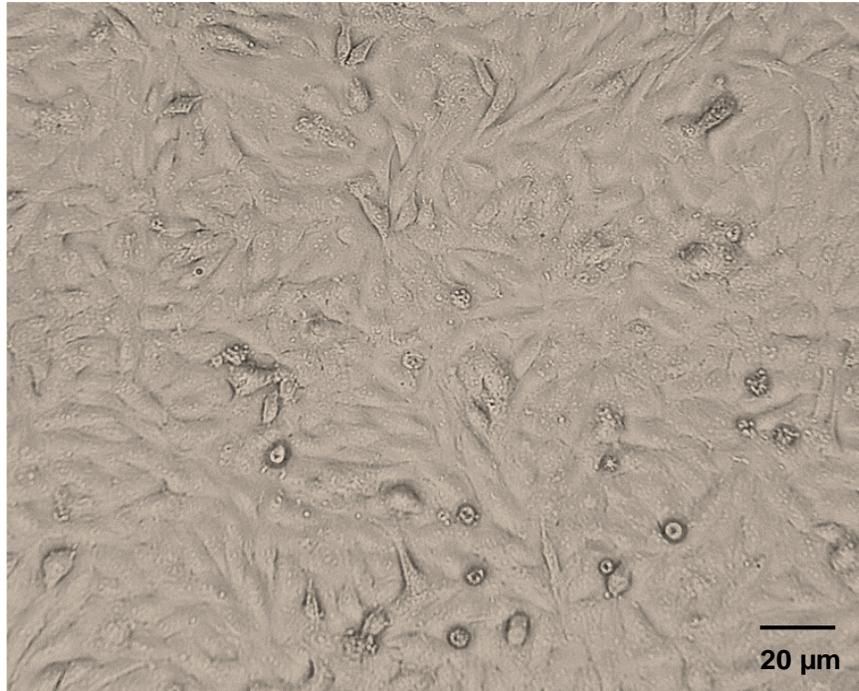


Figura 19. Cultivo en placa de 24 pozos de células HBEC-5i (pozo). Se observa la formación de la monocapa sin exposición al ZIKV 40X.

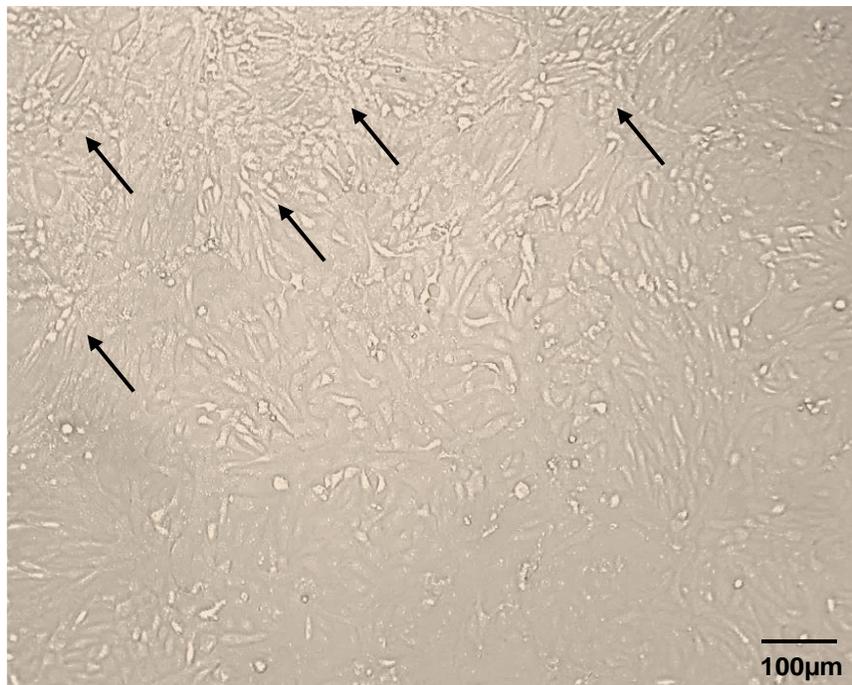


Figura 20. Efecto citopático por la exposición al ZIKV MR-766 con 0.1 MOI en células HBEC-5i a las 24 h p.i. Formación de sincicios visibles (señalados con flechas). 100X.

Expresión de claudina -3 por citometría de flujo en Células Endoteliales de Cerebro Humano (HBEC-5i).

Se evaluó la expresión de fluorescencia de la claudina -3 en la línea celular HBEC-5i en las primeras 24 h post exposición al ZIKV por citometría de flujo, a diferentes multiplicidades de infección (0.1, 1.0 y 10) y tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

Se aprecian diferencias en la emisión de fluorescencia en la población celular HBEC-5i en las gráficas dotplot (columna izquierda) y en los histogramas (columna derecha) a los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y MOI virales (0.1, 1.0 y 10). Por esta razón, la población total se dividió en dos subpoblaciones con diferente expresión de claudina -3. Destaca que la diferencia en la emisión de fluorescencia se presenta desde el grupo control.

En las **Fig. 21 A y B** se observa la expresión de claudina -3 en el grupo control, se aprecia una mayor fluorescencia en la SP1 (flecha roja) que en la SP2 (flecha azul). De manera opuesta, la expresión de fluorescencia en la SP1 disminuye con una MOI de 0.1. No así en la SP2, donde se tiene un incremento en su emisión (**Fig. 21 C y D**).

Este mismo patrón de expresión de fluorescencia se presenta con 1.0 MOI en las **Fig. 21 E y F**, donde se aprecia que la SP1 tiene una menor expresión de fluorescencia que la SP2. Una expresión similar en la fluorescencia se aprecia en las **Fig. 21 G y H**, donde con una MOI de 10 se observa un decremento en SP1, mientras que en SP2 se incrementa.

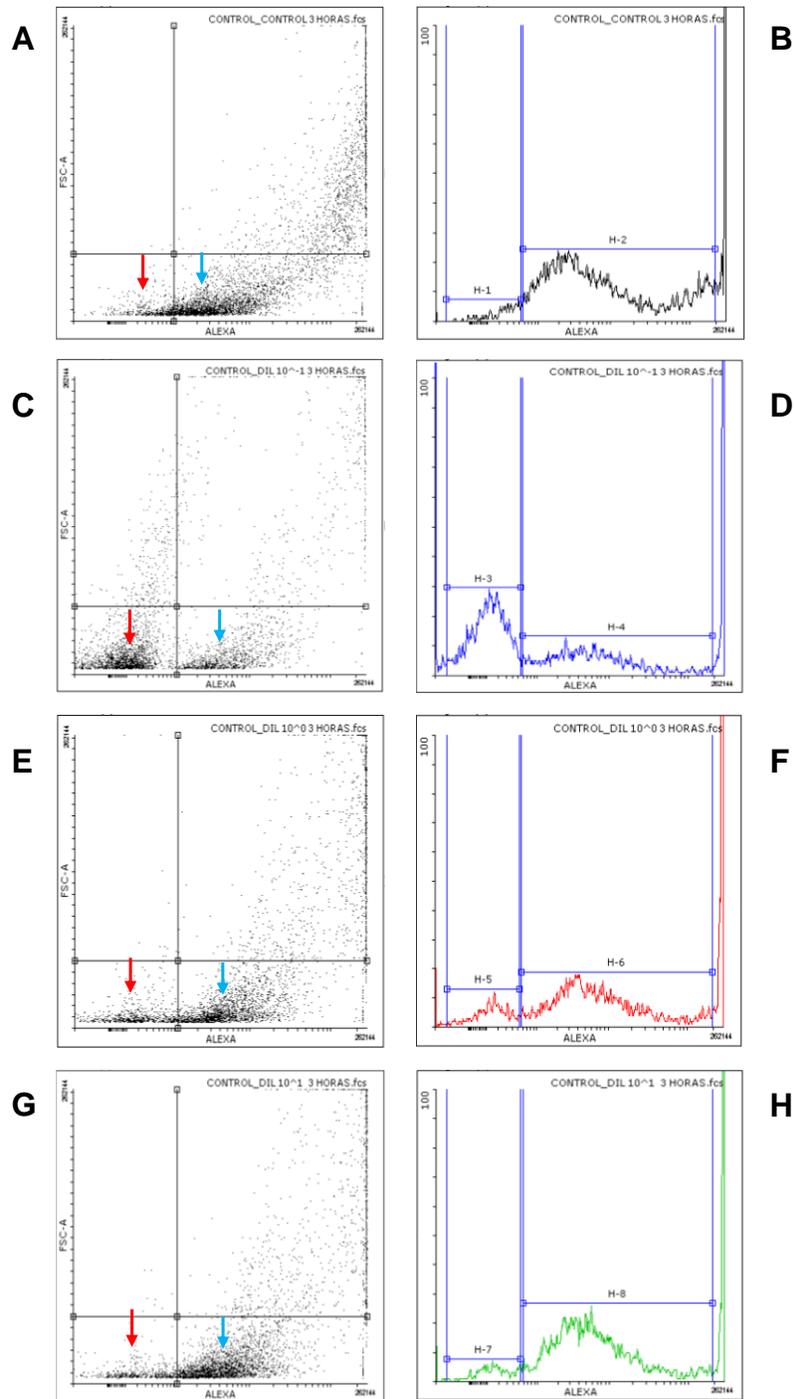


Figura 21. Expresión de la fluorescencia de claudina -3 en 5,000 eventos de la población de células HBEC-5i por citometría de flujo. Se muestran los dotplots (izquierda) e histogramas (derecha) con las dos subpoblaciones (marcadas con flechas rojas y azules) por su emisión de fluorescencia a las 3 h p.i. Eje X= claudina -3, eje Y= Tamaño celular. **A.** Dotplot grupo control. **B.** Histograma grupo control. **C.** Dotplot 0.1 MOI. **D.** Histograma 0.1 MOI. **E.** Dotplot 1.0 MOI. **F.** Histograma 1.0 MOI. **G.** Dotplot 10 MOI. **H.** Histograma 10 MOI. n=3.

Expresión de claudina -3 en unidades de fluorescencia (píxeles) en células HBEC-5i

Se muestra la expresión de claudina -3 en la población total de células HBEC-5i representada en unidades de fluorescencia (píxeles) correspondiente a la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (**Fig. 22, 23 y 24**).

La expresión de la fluorescencia de la claudina -3 en las células HBEC-5i presentó diferencias significativas ($*p<0.01$) a los diferentes tiempos post infección y MOI virales de ZIKV MR-766. En la **Fig. 22** se representan los tiempos de 30 min (872.5 píxeles) y 1 h (1321.5 píxeles), que son los que presentaron los cambios más destacados en los niveles de claudina -3 con una MOI de 0.1 comparados con el grupo control (3261 píxeles). Observamos el núcleo en rojo (N) teñido con yoduro de propidio y la claudina -3 en verde teñida con Alexa Flúor 488 (señalados con flechas). Se aprecia una reducción en la fluorescencia al comparar el grupo control con los tiempos de 30 min y 1 h respectivamente, teniendo la menor expresión al tiempo de 30 min (**Fig. 25 A**).

De la misma manera, en la **Fig. 23** se consideraron los tiempos de 3 (1685.5 píxeles) y 6 h (2058 píxeles) post exposición al ZIKV, que son los que presentaron mayores cambios en la expresión de claudina -3 con una MOI de 1.0. Se observan diferencias significativas ($*p<0.01$) al compararlos con el grupo control (3261 píxeles). Se muestra una disminución en la expresión de la claudina -3 y el valor más reducido se aprecia a las 3 h (**Fig. 25 B**).

Continuando con el mismo patrón, en la **Fig. 24**, se consideraron también los tiempos con los cambios más destacados en la expresión de claudina -3 con una MOI de 10. Existen diferencias significativas (*p<0.01) entre el grupo control (3261 pixeles) y los tiempos de 12 (2610.5 pixeles) y 24 h (2188 pixeles). Se aprecia un mayor decremento en la expresión de claudina -3 a las 24 h (**Fig. 25 C**).

En la **Fig. 25** se representa el análisis gráfico de nuestros datos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba post hoc de Dunnett, considerando una n=3 para cada experimento. Los datos estuvieron representados como la media ± EE y una *p<0.01.

A continuación, se presenta el cuadro con los valores de la expresión de fluorescencia de la claudina -3 (pixeles) a las diferentes MOI virales (0.1, 1.0 y 10) y tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

Cuadro 1. Valores de claudina -3 en unidades de fluorescencia (pixeles) en población total de células HBEC-5i						
Control	MOI 0.1 30 min	MOI 0.1 1 h	MOI 1.0 3h	MOI 1.0 6 h	MOI 10 12 h	MOI 10 24 h
3261	872.5	1321.5	1685.5	2058	2610.5	2188

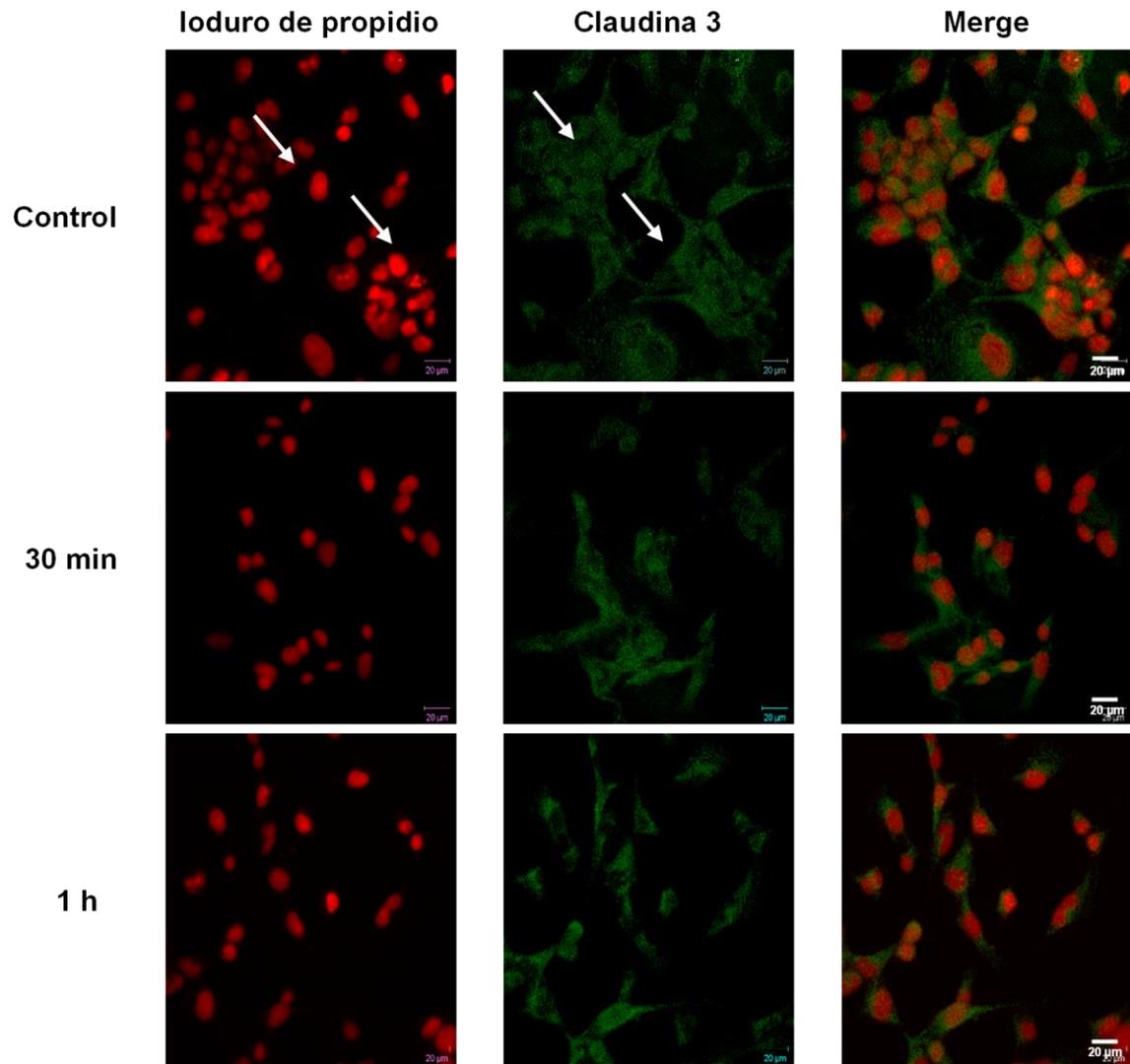


Figura 22. Expresión de fluorescencia de la claudina -3 en la población total de células HBEC-5i obtenida por microscopía confocal a los 30 min y 1 h post exposición al ZIKV a una MOI de 0.1. n=3.

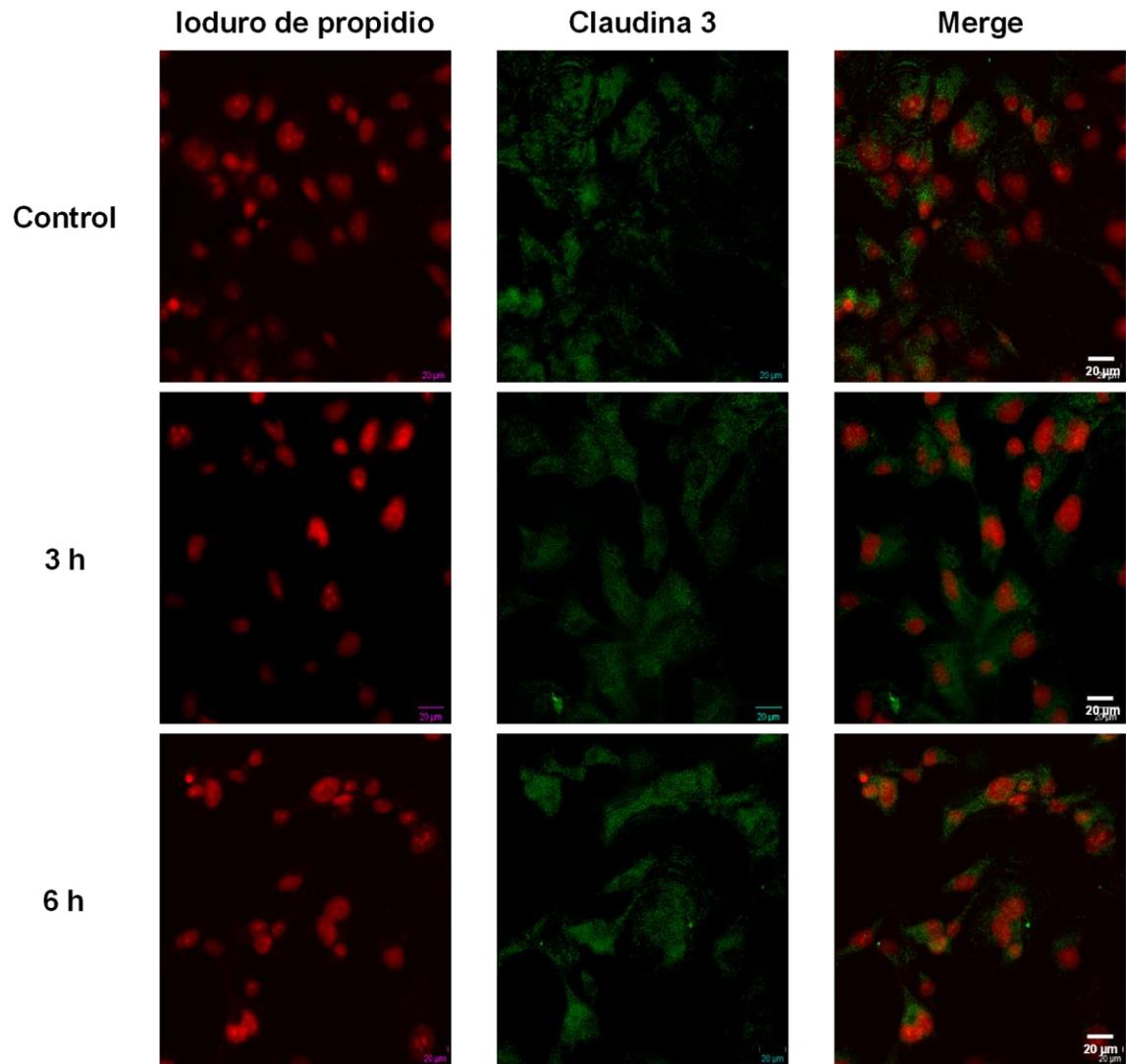


Figura 23. Expresión de fluorescencia de la claudina -3 en la población total de células HBEC-5i obtenida por microscopía confocal a las 3 y 6 h post exposición al ZIKV a una MOI de 1.0. n=3.

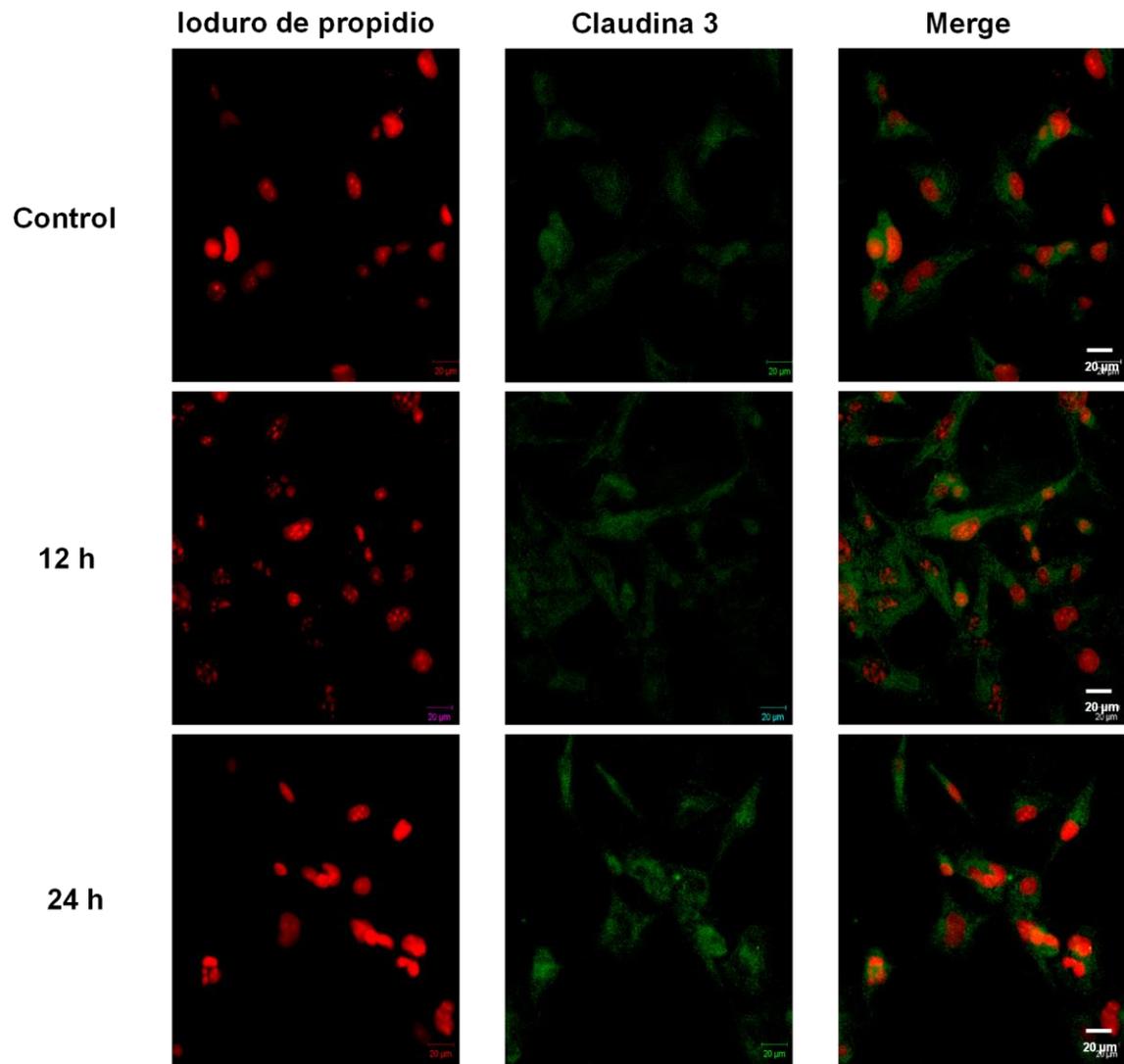


Figura 24. Expresión de fluorescencia de la claudina -3 en la población total de células HBEC-5i obtenida por microscopía confocal a las 12 y 24 h post exposición al ZIKV a una MOI de 10. $n=3$.

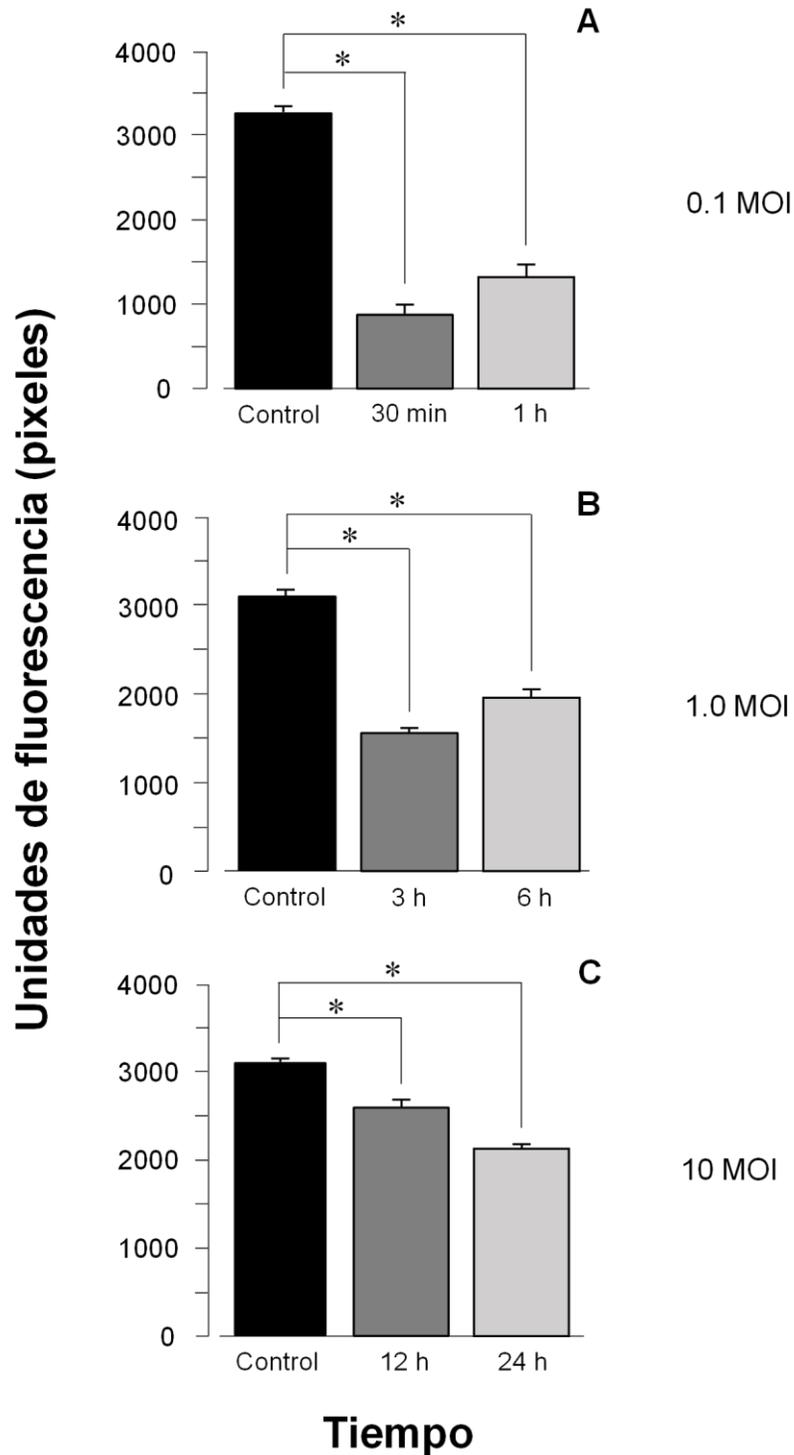


Figura 25. Expresión de la claudina -3 en unidades de fluorescencia (píxeles) a las diferentes MOI virales (0.1, 1.0 y 10) y a los tiempos más destacados de cada una (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) post exposición al ZIKV. **A.** Expresión con 0.1 MOI a los 30 min y 1 h. **B.** Expresión con 1.0 MOI a las 3 h y 6 h. **C.** Expresión con 10 MOI a las 12 h y 24 h. * $p < 0.01$. $n=3$. Prueba estadística ANOVA de una vía y prueba post hoc de Dunnett.

Expresión de claudina -3 (% de Gates) en células HBEC-5i

Se evaluó la expresión de claudina -3 en las células HBEC-5i por fluorescencia, expresada en % de Gates o % de células positivas a claudina -3, a diferentes multiplicidades de infección (0.1, 1.0 y 10 MOI) de ZIKV y tiempos post infección (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) (**Fig. 26**) (**Cuadro 2**).

En la **Fig. 26 A**, se representa la expresión de la claudina -3 post inoculación con ZIKV a los 30 min. La exposición a 0.1, 1.0 y 10 MOI de ZIKV induce una fluorescencia (% de Gates) de $79.3 \pm 0.06\%$, $90.43 \pm 0.90\%$ y $92.62 \pm 0.24\%$ respectivamente, presentando diferencias significativas con respecto al valor de sham ($99.51 \pm 0.06\%$), con una $*p < 0.01$ en una prueba de ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Dunnett. Observamos que la infección por ZIKV a diferentes MOI reduce la fluorescencia relacionada a la expresión de claudina -3.

Del mismo modo, en la **Fig. 26 B** a 1h, se aprecia un decremento en la expresión de la proteína, con 0.1 MOI ($40.54 \pm 0.37\%$) y 1.0 MOI ($92.4 \pm 0.24\%$), lo que representa diferencias significativas al compararlo con el sham ($94.84 \pm 0.17\%$). No así con 10 MOI ($95.34 \pm 0.21\%$) (**Cuadro 2**).

La **Fig. 26 C** representa una reducción en los valores de fluorescencia a 3 h post inoculación. Existen diferencias significativas con las exposiciones de 0.1, 1.0 y 10 MOI ($62.92 \pm 0.18\%$, $90.58 \pm 0.16\%$ y $93.94 \pm 0.04\%$) comparados con el sham ($97.46 \pm 0.10\%$). Así, la inoculación a 0.1 MOI produce la menor expresión.

En la **Fig. 26 D**, la exposición viral durante 6 h muestra una reducción la expresión de fluorescencia. Con 0.1, 1.0 y 10 MOI ($87.34 \pm 0.06\%$, $93.5 \pm 0.03\%$ y

91.82±0.03%) se aprecian diferencias significativas en los valores con respecto al sham (91.44±0.04%).

De la misma manera, en la **Fig. 26 E** se observa un decremento en la expresión de la claudina -3 a las 12 h post exposición. Se muestran diferencias significativas entre las exposiciones a 0.1, 1.0 y 10 MOI (57.78±0.03%, 89.78±0.03% y 97.04±0.03%) comparadas con el sham (95.86±0.05%). En la inoculación con 0.1 MOI durante 12 h se presenta el mayor decremento en la fluorescencia en comparación con el grupo sham.

En la **Fig. 26 F** se aprecia una reducción en % de Gates a las 24 h post infección. Existen diferencias significativas con 0.1, 1.0 y 10 MOI (51.82±0.10%, 71.38±0.03% y 95.06±0.02%) respecto al sham (93.16±0.04%). Con 0.1 MOI (51.82±0.099%) se tiene un mayor decremento en la expresión de claudina -3 por fluorescencia.

Destaca en la **Fig. 26** que la exposición a 0.1 MOI presenta una menor fluorescencia a diferentes tiempos de inoculación.

A continuación, se presenta el cuadro con los porcentajes de expresión total de fluorescencia de la claudina -3 en la línea celular HBEC-5i a diferentes tiempos y MOI virales.

Cuadro 2. Valores de fluorescencia totales (% de Gates) de la expresión de la claudina -3 post exposición al ZIKV a diferentes tiempos (30 min, 1 h, 3h, 6 h, 12 y 24h).

Tiempo	GRUPO SHAM (% fluorescencia)	MOI (% de fluorescencia)		
		0.1	1.0	10
30 min	99.5±0.06	79.3±0.06	90.4±0.09	92.6±0.24
1 h	94.8±0.17	40.5±0.37	92.4±0.24	95.3±0.21
3 h	97.5±0.10	62.9±0.18	90.6±0.16	93.9±0.04
6	91.4±0.04	87.3±0.06	93.5±0.03	91.8±0.03
12	95.9±0.05	57.8±0.03	89.8±0.03	97.0±0.03
24	93.2±0.04	51.8±0.10	71.4±0.03	95.0±0.02

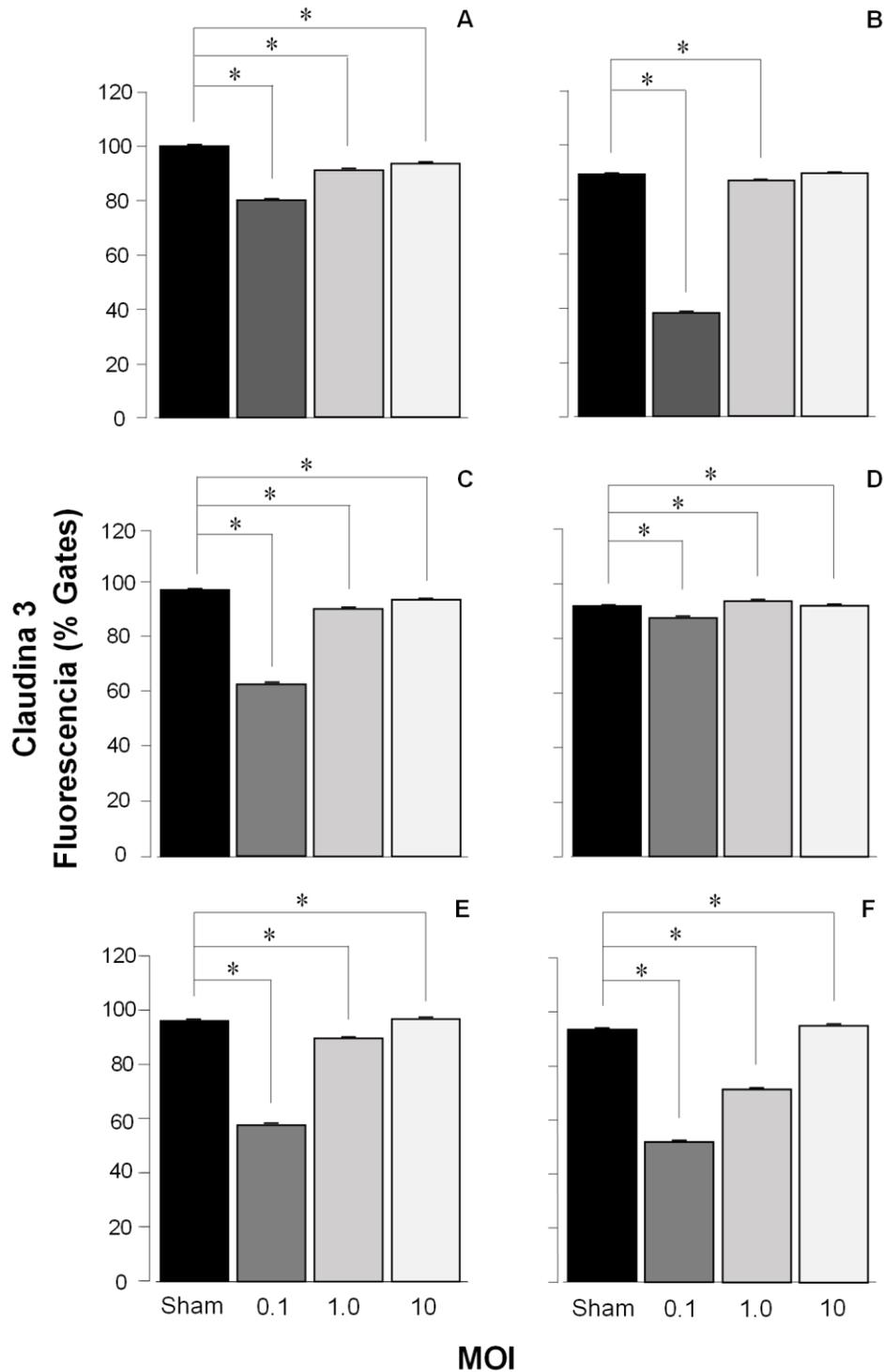


Figura 26. Expresión de la fluorescencia (% Gates) de claudina -3 a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) a diferentes tiempos en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min. **B.** Expresión a 1 hora. **C.** Expresión a 3 horas. **D.** Expresión a 6 horas. **E.** Expresión a 12 horas. **F.** Expresión a 24 horas. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Dunnett.

Expresión de claudina -3 (% de Gates) en subpoblación 1 de células HBEC- 5i

En la **Figura 27 (Fig. 27 A-27 F)**, se observa en la SP1 la expresión de la fluorescencia de la claudina -3 (% de Gates) a las diferentes MOI virales (0.1, 1.0 y 10) y tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h). Los valores de la fluorescencia se presentan en el **Cuadro 3**.

De manera específica, en la **Fig. 27 A**, los valores de fluorescencia post inoculación a los 30 min, 0.1, 1.0 y 10 MOI ($69.22 \pm 0.006\%$, $58.48 \pm 0.08\%$ y $43.72 \pm 0.02\%$, respectivamente), muestran diferencias significativas ($*p < 0.01$) con respecto al sham ($67.82 \pm 0.02\%$), destacando un mayor decremento a 10 MOI.

Del mismo modo, se observa que la fluorescencia (% de Gates) disminuye a 1 h después de la infección por ZIKV con las diferentes MOI ($57.16 \pm 0.02\%$, $39.72 \pm 0.02\%$ y $23.04 \pm 0.01\%$) comparadas con el sham ($62.77 \pm 0.02\%$). Con 10 MOI se aprecia un decremento mayor (**Fig. 27 B**).

Este mismo patrón se observa a las 3 h posteriores a la exposición al ZIKV. Al determinar los valores de la fluorescencia, a diferentes diluciones virales 0.1, 1.0 y 10 MOI ($58.66 \pm 0.02\%$, $45.86 \pm 0.04\%$ y $29.92 \pm 0.04\%$, respectivamente), existen diferencias significativas con respecto al grupo sham ($67.92 \pm 0.02\%$) (**Fig. 27 C**). Con 10 MOI se percibe una reducción mayor de la fluorescencia.

A las 6 h de inoculación con ZIKV, se observa que sólo existen diferencias significativas entre 1.0 ($36.22 \pm 0.02\%$) y 10 ($44.24 \pm 0.02\%$) MOI con respecto al grupo sham ($65.04 \pm 0.03\%$). Sobresale una mayor reducción a 0.1 MOI (**Fig. 27 D**).

En la **Fig. 27 E**, a las 12 h posteriores a la exposición, con 0.1, 1.0 y 10 MOI ($54.64\pm 0.02\%$, $38.44\pm 0.04\%$ y $33.88\pm 0.02\%$, respectivamente) se observan diferencias significativas con respecto al grupo sham ($67.76\pm 0.04\%$). A una MOI de 10 se tiene la menor expresión de la claudina -3.

Los valores de expresión de fluorescencia con 0.1, 1.0 y 10 MOI ($53.06\pm 0.006\%$, $41.7\pm 0.01\%$ y $31.80\pm 0.006\%$ respectivamente) muestran decremento a las 24 h de inoculación con ZIKV en comparación con el grupo sham ($58.78\pm 0.01\%$). Se observa con 10 MOI una mayor disminución de fluorescencia. (**Fig. 27 F**).

Se observa un decremento en los valores de fluorescencia con las diferentes MOI virales (0.1, 1.0 y 10), destacando que con 10 MOI se tiene la menor expresión de claudina -3.

Cuadro 3. Valores de fluorescencia en la SP1 (% de Gates) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes tiempos (30 min, 1 h, 3h, 6 h, 12 y 24h).

Tiempo	GRUPO SHAM (% de fluorescencia)	MOI (% de fluorescencia)		
		0.1	1.0	10
30 min	67.8±0.02	69.2±0.006	58.5±0.08	43.7±0.02
1 h	62.8±0.02	57.2±0.02	39.7±0.02	23.0±0.01
3 h	67.9±0.02	58.7±0.02	45.9±0.04	29.9±0.04
6	65.0±0.03	65.1±0.02	36.2±0.02	44.2±0.02
12	67.8±0.04	54.6±0.02	38.4±0.04	33.9±0.02
24	58.8±0.01	53.0±0.006	41.7±0.01	31.8±0.006

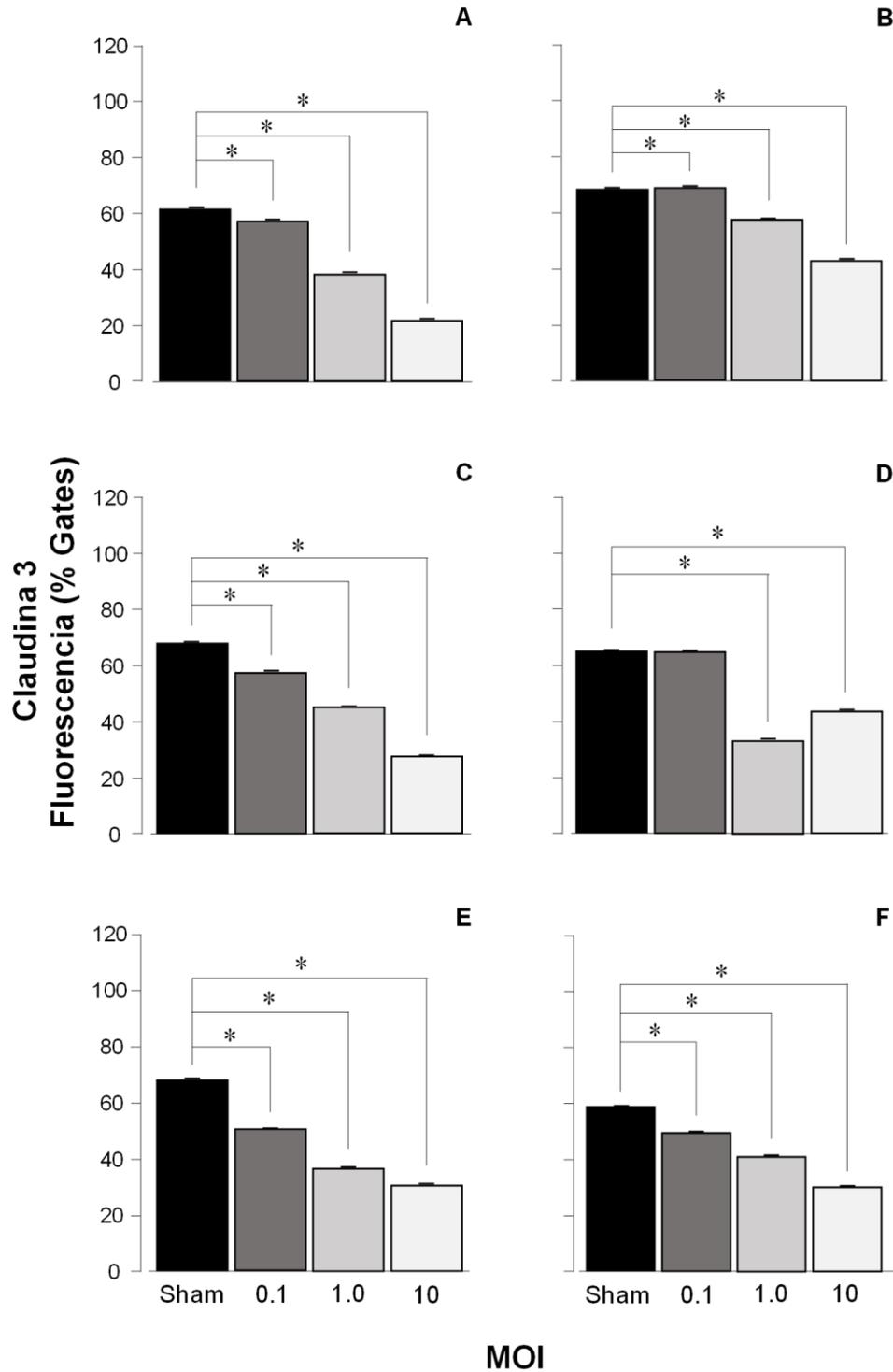


Figura 27. Expresión de la fluorescencia de claudina -3 (% Gates) a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) y a diferentes tiempos en la subpoblación 1 (SP1) en células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min; **B.** Expresión a 1 hora; **C.** Expresión a 3 horas. **D.** Expresión a 6 horas. **E.** Expresión a 12 horas. **F.** Expresión a 24 horas. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $**p < 0.01$. $n = 3$.

Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la subpoblación 2 de células HBEC-5i

Se observa la expresión de fluorescencia (% de Gates) de la claudina -3 en la subpoblación 2 (SP2) con diferentes exposiciones de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI) y tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) (**Fig. 28 A-F, Cuadro 4**).

A los 30 min post inoculación con ZIKV, se observan diferencias significativas (con un valor de significancia de $*p<0.01$) en el incremento de la fluorescencia dependiendo de la concentración viral 0.1, 1.0 y 10 ($23.4\pm 0.006\%$, $31.96\pm 0.01\%$ y $35.6\pm 0.15\%$ respectivamente) comparado con el grupo sham ($19.75\pm 0.01\%$). A mayor concentración viral, mayor incremento de fluorescencia (**Fig. 28 A**).

Se observa a 1 h, posterior a la infección viral, un incremento en la fluorescencia con las MOI virales 0.1 ($38.18\pm 0.006\%$) y 1.0 ($52.68\pm 0.006\%$) comparado con el grupo sham ($32.07\pm 0.0057\%$). No obstante, con 10 MOI ($17.5\pm 0.01\%$) se aprecia un decremento de la fluorescencia comparada con el grupo sham (**Fig. 28 B**).

Este mismo patrón de expresión, se observa a las 3 h después de la exposición al virus (**Fig. 28 C**). En las MOI 0.1 ($35.28\pm 0.01\%$) y 1.0 ($44.72\pm 0.01\%$) existe un incremento en la expresión de la fluorescencia y un decremento a 10 MOI ($32.98\pm 0.02\%$) mostrando diferencias significativas con el grupo sham ($29.54\pm 0.0152\%$).

La **Fig. 28 D** muestra que a las 6 h post inoculación existe un aumento considerable del valor de la fluorescencia con 1.0 MOI ($57.28\pm 0.02\%$) mostrando

diferencias significativas con respecto al sham ($26.4 \pm 0.0115\%$). Del mismo modo, existe un incremento de las MOI 0.1 ($26.70 \pm 0.01\%$) y 10 ($43.10 \pm 0.01\%$) comparado con el grupo sham.

Un comportamiento semejante ocurre a las 12 h después de la infección por ZIKV (**Fig. 28 E**). Con las MOI virales 0.1 ($42.4 \pm 0.02\%$) y 1.0 ($57.35 \pm 0.02\%$) MOI, se aprecian un incremento en los valores de fluorescencia, mientras que con 10 MOI ($23.90 \pm 0.006\%$) una reducción. Mostrando diferencias significativas ($*p < 0.01$) con todos los grupos experimentales diferencias significativas con respecto al grupo sham ($28.11 \pm 0.0176\%$).

A las 24 h posteriores a la exposición al virus, se observan diferencias significativas entre las MOI 0.1, 1.0 y 10 ($42.00 \pm 0.40\%$, $29.68 \pm 0.02\%$ y $20.02 \pm 0.02\%$ respectivamente) y el grupo sham ($34.38 \pm 0.0115\%$). Con 0.1 MOI se aprecia un incremento de la fluorescencia, no así a 1.0 y 10 MOI donde se muestra una reducción (**Fig. 28 F**).

En el siguiente cuadro se presentan los valores de fluorescencia en la SP2 (% de Gates) de la expresión de la claudina -3 por inoculación con ZIKV a diferentes tiempos (30 min, 1 h, 3h, 6 h, 12 y 24h).

Cuadro 4. Valores de fluorescencia en la SP2 (% de Gates) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes tiempos (30 min, 1 h, 3h, 6 h, 12 y 24h).

Tiempo	GRUPO SHAM (% de fluorescencia)	MOI (% de fluorescencia)		
		0.1	1.0	10
30 min	19.8±0.01	23.4±0.006	32.0±0.01	35.6±0.15
1 h	32.0±0.006	38.2±0.006	52.7±0.006	17.5±0.01
3 h	29.5±0.02	35.3±0.01	44.7±0.01	33.0±0.02
6	26.4±0.01	26.7±0.01	57.3±0.02	43.1±0.01
12	28.1±0.02	42.4±0.02	57.4±0.02	23.9±0.006
24	34.4±0.01	42.0±0.40	29.7±0.02	20.0±0.02

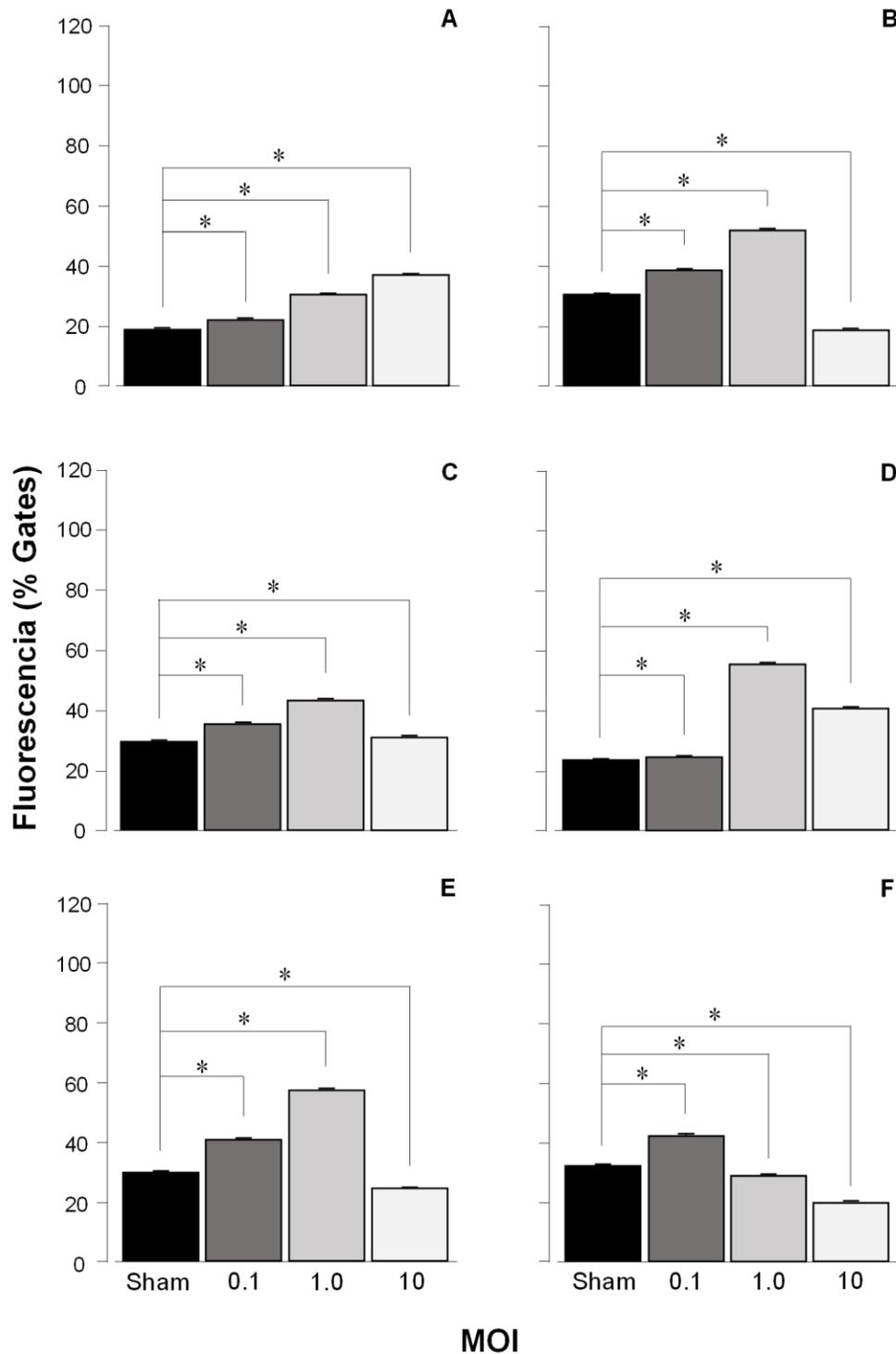


Figura 28. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (% Gates) a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) y a diferentes tiempos en la subpoblación 2 (SP2) en células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min; **B.** Expresión a 1 hora; **C.** Expresión a 3 horas. **D.** Expresión a 6 horas. **E.** Expresión a 12 horas. **F.** Expresión a 24 horas. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n = 3$.

Expresión de claudina -3 (% de Gates) en células HBEC-5i en el tiempo

Se realizó la comparación de los valores de la expresión de la claudina -3 con cada MOI viral (0.1, 1.0 y 10) y su respuesta en el tiempo (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) (**Fig. 29**). El efecto de la inoculación con 0.1 MOI en el tiempo muestra un decremento de la expresión de la claudina -3 con respecto al sham. Destaca que a 1 h se presenta un reducido valor en la expresión posterior a la exposición con ZIKV (**Fig. 29 A**). Aunque, este valor aumenta el tiempo posterior, y un mayor incremento a las 6 h, dándose una fluctuación de expresión con respecto al tiempo. Se observa que existen diferencias significativas ($*p<0.01$) al comparar la misma MOI de ZIKV en el tiempo comparado con el grupo sham (**ver Cuadro 2**).

Con respecto a la MOI de 1.0 en el tiempo, se muestra a las 24 h después de la inoculación viral, el valor más bajo de fluorescencia. Presentando también diferencias significativas entre los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) con el grupo sham (**Fig. 29 B**).

En la **Fig. 29 C**, con 10 MOI hay diferencias significativas entre el grupo sham y los tiempos 30 min, 1, 3, 6, 12, y 24 h.

Con estos datos, se destaca la fluctuación de los valores de la expresión de la claudina -3 al 0.1 MOI con respecto al tiempo.

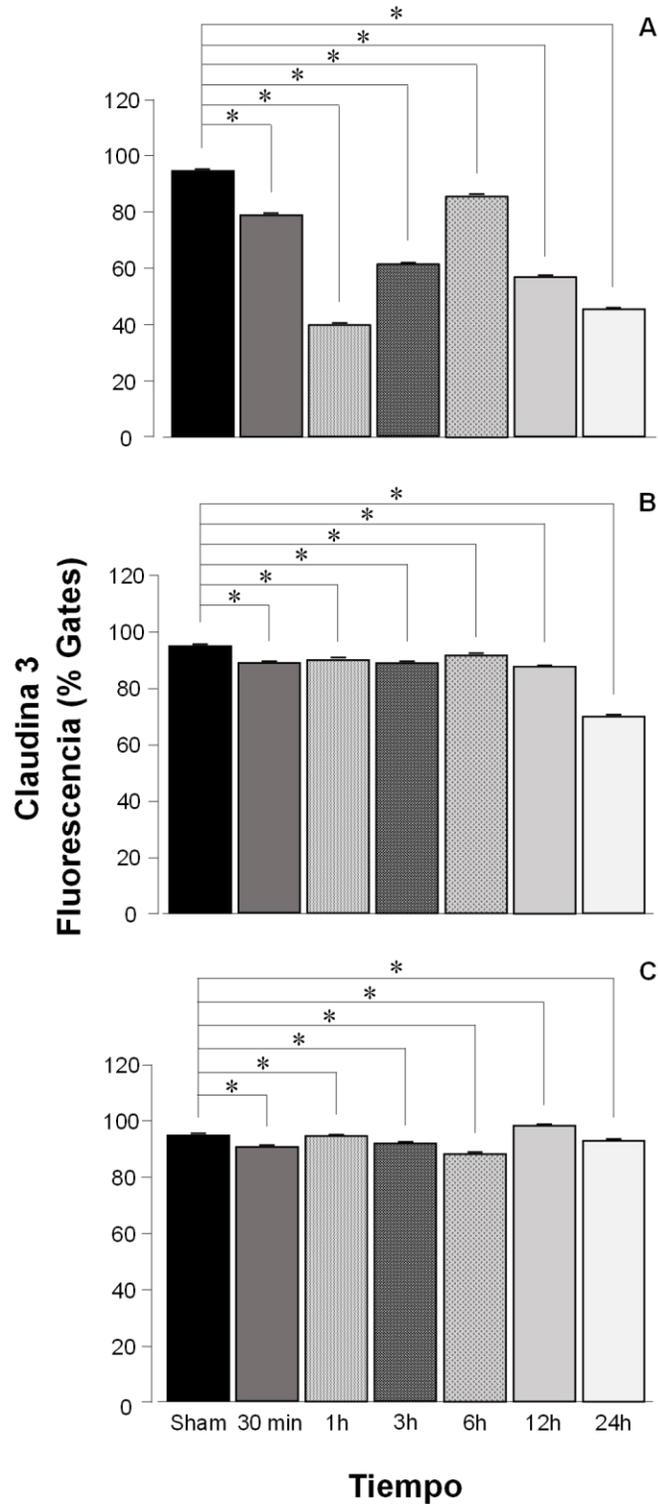


Figura 29. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (% Gates) a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por cada inoculación de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI) en células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI; **B.** Expresión con 1.0 MOI; **C.** Expresión con 10 MOI. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la subpoblación 1 de células HBEC-5i en el tiempo

Se presenta la expresión de fluorescencia (% de Gates) en la SP1 a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y exposiciones de ZIKV (0.1, 1 y 10 MOI).

Con una MOI viral de 0.1 se observa una fluctuación de la la expresión de la fluorescencia. A las 24 h, se observa el mayor decremento de expresión posterior a la inoculación con ZIKV. Se tienen diferencias significativas (* $p < 0.01$) entre el grupo sham y los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) (**Fig. 30 A**).

Con la evaluación a 1.0 MOI, se presenta también una fluctuación en la la expresión de la claudina -3 (**Fig. 30 B**). A las 3 h post exposición al virus, existe la máxima reducción en la expresión comparada con el grupo sham. Encontrándose diferencias significativas entre los tiempos con respecto al sham.

En la **Fig. 30 C** a una MOI de 10, se muestra de igual manera una fluctuación en la expresión de la Claudina -3. Al tiempo de 1 h, el valor de la fluorescencia presenta la mayor disminución. Se aprecian diferencias significativas en los tiempos comparadas con el grupo sham.

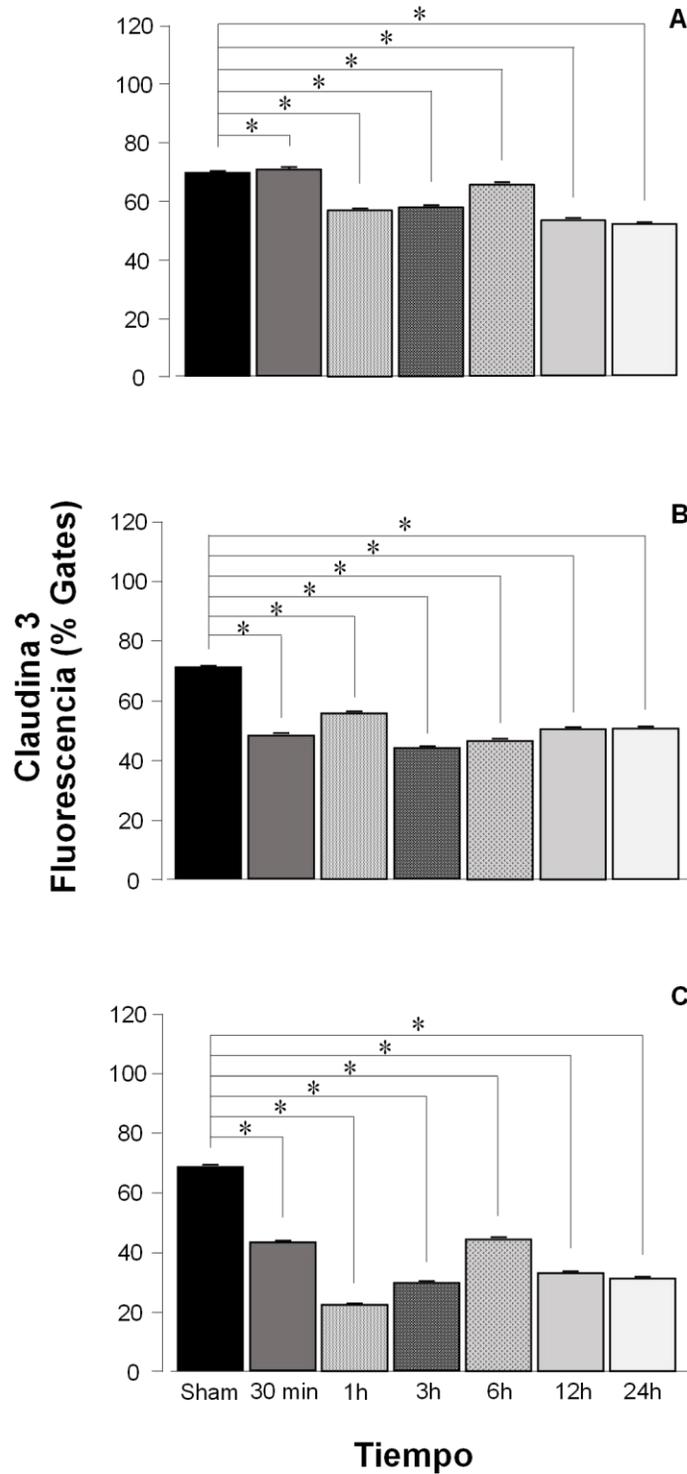


Figura 30. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (% Gates) a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por cada MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en la subpoblación 1 (SP1) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI; **B.** Expresión con 1.0 MOI; **C.** Expresión con 10 MOI. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (% de Gates) en la subpoblación 2 de células HBEC-5i en el tiempo.

Se aprecia en la **Figura 31** la expresión de la fluorescencia (% de Gates) en la SP2 a diferentes tiempos y con las multiplicidades de infección (0.1, 1.0 y 10) de ZIKV.

Con una inoculación con 0.1 MOI se presenta una fluctuación en la expresión de la fluorescencia de claudina -3. A los 30 min post exposición se tiene el valor más reducido; sin embargo, a las 12 h, se presenta un incremento y la mayor expresión. Se observan diferencias significativas ($*p<0.01$) ente el grupo sham y los tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) (**Fig. 31 A**).

De la misma manera, en la **Fig. 31 B** con una MOI de 1.0, se presenta una fluctuación en la fluorescencia de la claudina -3. A los 30 min se muestra la mayor reducción, en cambio, a las 12 h hay un aumento y se muestra el valor más alto de expresión. Se aprecian diferencias significativas entre el grupo sham y los demás tiempos.

A una MOI de 10 (**Fig. 31 C**) se muestra también una fluctuación en la expresión de la proteína a los diferentes tiempos post infección. Al tiempo de 1h se aprecia el valor más reducido, mientras que a las 6 h se observa la mayor expresión de claudina -3. Al comparar los diferentes tiempos con el grupo sham se aprecian diferencias significativas.

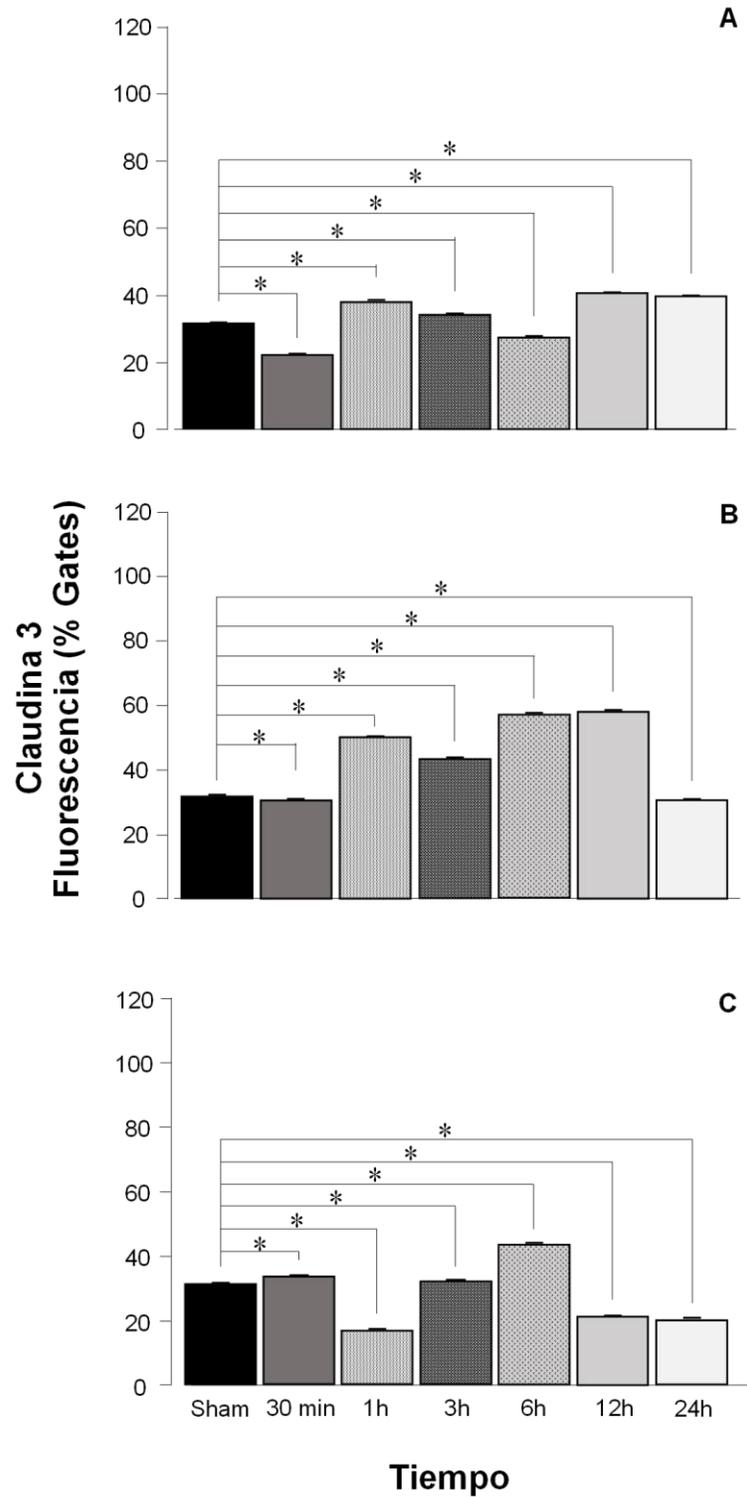


Figura 31. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (% Gates) a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por cada MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en la subpoblación 2 (SP2) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI; **B.** Expresión con 1.0 MOI; **C.** Infección con 10 MOI. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (MIF) en células HBEC-5i

Se muestra en la **Figura 32** la intensidad media de la fluorescencia (MIF) de claudina -3 en la población total de las células HBEC-5i a diferentes exposiciones de ZIKV y tiempos. A los 30 min post inoculación con ZIKV se puede observar en la **Fig. 32 A** que los niveles de fluorescencia tienen un incremento. Con una MOI de 0.1 se tiene el valor más bajo de fluorescencia, mientras que con 10 MOI se presenta el máximo. Existen diferencias significativas (* $p < 0.01$) entre el grupo sham (77.16 ± 0.01) y las MOI virales 0.1 (51.79 ± 0.006), 1.0 (75.04 ± 0.01) y 10 MOI (80.18 ± 0.01).

En la **Fig. 32 B**, a 1 h post exposición viral se muestra un incremento en la fluorescencia a 0.1 y 1.0 MOI, en esta última MOI, se muestra su valor más alto. Se destaca que a una MOI de 10 se presenta la mayor reducción. De la misma manera, se aprecian diferencias significativas en las diferentes MOI y el grupo sham (**ver Cuadro 5**).

Este mismo patrón se muestra en la **Fig. 32 C** a las 3 h post exposición, donde existe también un incremento de fluorescencia a 0.1 y 1.0 MOI, con una máxima expresión a 1.0 MOI. El valor más bajo se muestra con 10 MOI. Asimismo, se observan diferencias significativas al comparar el sham y las diferentes exposiciones de ZIKV (**Cuadro 5**).

A las 6 h posteriores a la inoculación con ZIKV, se muestra un incremento en la expresión de fluorescencia. No obstante, se aprecia a 0.1 MOI la mayor reducción, mientras que con 1.0 MOI se observa la máxima expresión. De la misma

manera, hay diferencias significativas al comparar las diferentes exposiciones con el grupo sham (**Fig. 32 D**) (ver **cuadro 5**).

Se aprecia con 0.1 y 1.0 MOI a las 12 h post exposición un incremento en la expresión de fluorescencia (**Fig. 32 E**). Se destaca que con 1.0 MOI viral se tiene la mayor fluorescencia, mientras que con 10 MOI se tiene el valor más bajo. Existen diferencias significativas entre las diferentes MOI en comparación con el grupo sham (**Cuadro 5**).

En la **Fig. 32 F** a las 24 h post infección por ZIKV se muestra un decremento en la expresión de claudina -3, mostrando con 0.1 MOI su valor máximo. No así, con 1.0 y 10 MOI donde se aprecia un decremento, mostrándose a una MOI de 10 el valor más reducido de expresión. También se aprecian diferencias significativas entre el grupo sham y las diferentes MOI (**consultar cuadro 5**).

Cuadro 5. Valores de fluorescencia totales (MIF) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes diluciones (0.1, 1.0 y 10 MOI) y tiempos (30 min, 1 h, 3h, 6 h, 12 y 24h).

Tiempo	GRUPO SHAM (% de fluorescencia)	MOI (% de fluorescencia)		
		0.1	1	10
30 min	77.2±0.01	51.8±0.006	75.04±0.01	80.2±0.01
1 h	74.6±0.01	91.6±0.006	130.0±0.01	27.7±0.006
3 h	80.0±0.02	84.6±0.006	110.1±0.01	68.2±0.009
6	71.5±0.01	63.1±0.006	134.6±0.01	99.1±0.006
12	74.6±0.01	101.6±0.01	121.7±0.01	44.3±0.01
24	77.7±0.01	102.6±0.02	66.7±0.01	36.5±0.01

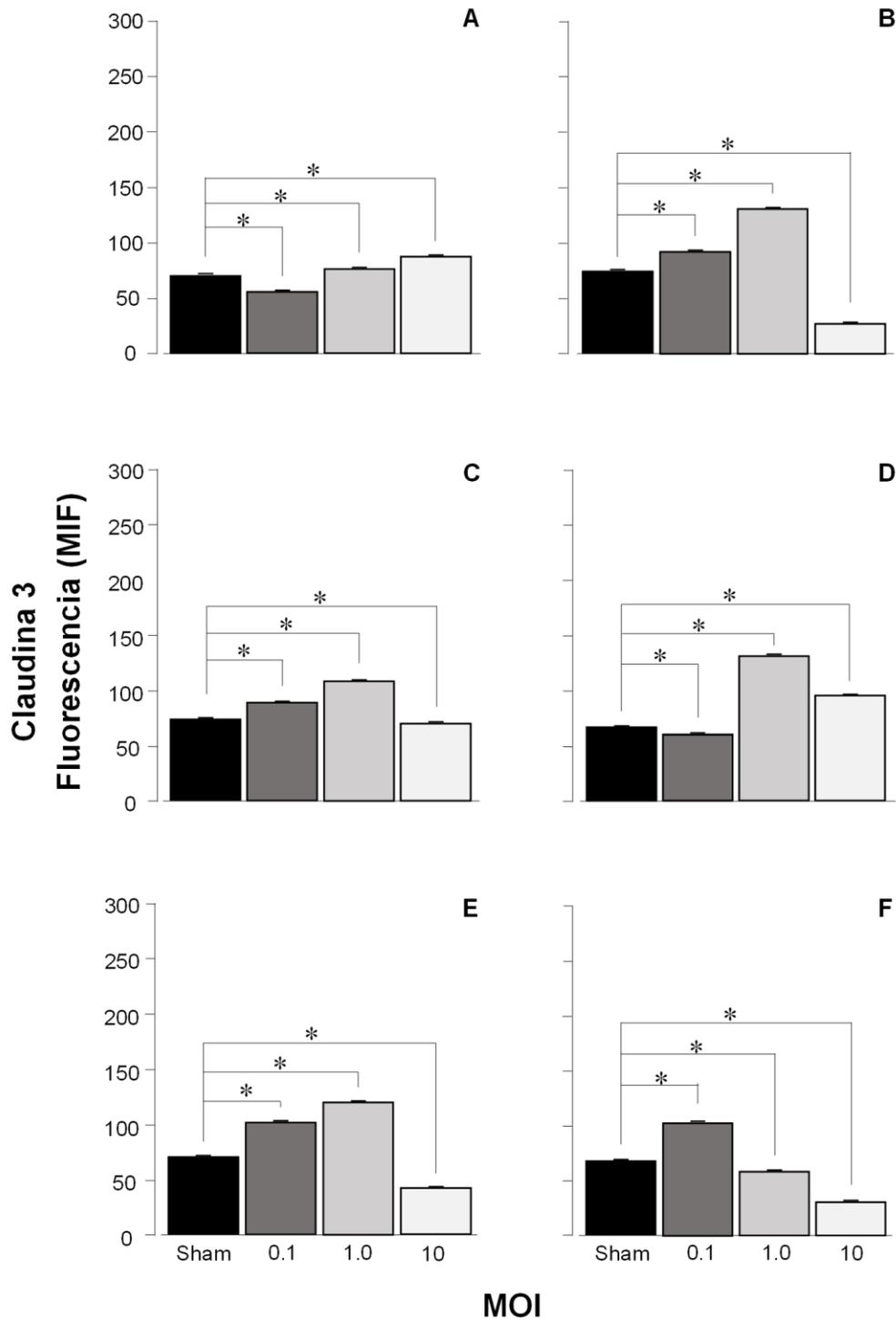


Figura 32. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) en cada tiempo (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min; **B.** Expresión a 1h; **C.** Expresión a 3 h; **D.** Expresión a 6 h; **E.** Expresión a 12 h; **F.** Expresión a 24 h. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (MIF) en la subpoblación 1 de células HBEC-5i.

En la siguiente figura (**Fig. 33**) se muestra la expresión de la fluorescencia (intensidad media de fluorescencia MIF) de la claudina -3 en la SP1 de las células HBEC-5i a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y exposiciones de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI). Se muestra un decremento a los 30 min post inoculación al virus en la expresión de fluorescencia (**Fig.33 A**). El valor más reducido se presenta con una MOI de 1.0, mientras que el máximo se muestra en el sham. Aunado a esto, se aprecian también diferencias significativas ($*p<0.01$) al comparar las MOI (0.1, 1.0 y 10) contra el grupo sham (**Cuadro 6**).

En la **Fig. 33 B** a 1 h posterior a la exposición, se observa un decremento en la expresión de fluorescencia. Se destaca que la expresión más baja se muestra con una MOI de 10. Por el contrario, con 0.1 MOI existe un aumento y se expresa su valor máximo. Se aprecian diferencias significativas entre el grupo sham y las MOI virales (**Cuadro 6**).

A las 3 h post exposición, se muestra una reducción en la expresión de claudina -3. Con 1.0 y 10 MOI existe una reducción en los valores, mostrando a 10 MOI la menor expresión de fluorescencia; sin embargo, a 0.1 MOI se tiene un aumento y el valor más alto. De la misma manera se aprecian diferencias significativas al comparar el grupo sham y las MOI virales (**Cuadro 6**) (**Fig. 33 C**).

Se observa en la **Fig. 33 D** un decremento a las 6 h después de la infección por el virus en los valores de fluorescencia. Con 1.0 MOI se aprecia la mayor reducción de expresión, mientras que con 0.1 MOI se tiene el valor máximo. De

igual manera hay diferencias significativas al comparar las exposiciones de ZIKV con el sham (**ver cuadro 6**).

Existe un decremento en la expresión de fluorescencia a las 12 h post inoculación. Se muestra con 1.0 MOI la mayor reducción de claudina -3, mientras que con una MOI de 10 destaca un incremento y su valor máximo. Se tienen diferencias significativas comparando las diferentes MOI contra el grupo sham (**Cuadro 6**) (**Fig. 33 E**).

En la **Fig. 33 F** se observa a las 24 h después de la exposición viral que con 0.1 y 10 MOI hay un incremento en la fluorescencia, teniendo a 10 MOI su máxima expresión. Se destaca que con 1.0 MOI hay una reducción y se muestra su valor más bajo. De forma semejante se presentan diferencias significativas al comparar el grupo sham con las exposiciones de ZIKV (**ver cuadro 6**).

Cuadro 6. Valores de fluorescencia (MIF) de la expresión de la claudina -3 en la SP1 por exposición al ZIKV a diferentes diluciones (0.1, 1.0 y 10 MOI) y tiempos (30 min, 1 h, 3h, 6 h, 12 y 24h).

Tiempo	SHAM (% de fluorescencia)	MOI (% de fluorescencia)		
		0.1	1.0	10
30 min	210.6±0.01	185.9±0.02	165.9±0.02	170.3±0.01
1 h	190.8±0.02	215.1±0.02	184.5±0.02	149.7±0.02
3 h	190.3±0.03	269.4±0.01	150.5±0.03	141.0±0.01
6	232.9±0.02	231.1±0.01	140.2±0.02	141.6±0.02
12	205.6±0.02	205.2±0.02	190.6±0.01	244.1±0.02
24	192.1±0.02	242.3±0.006	152.9±0.01	243.1±0.01

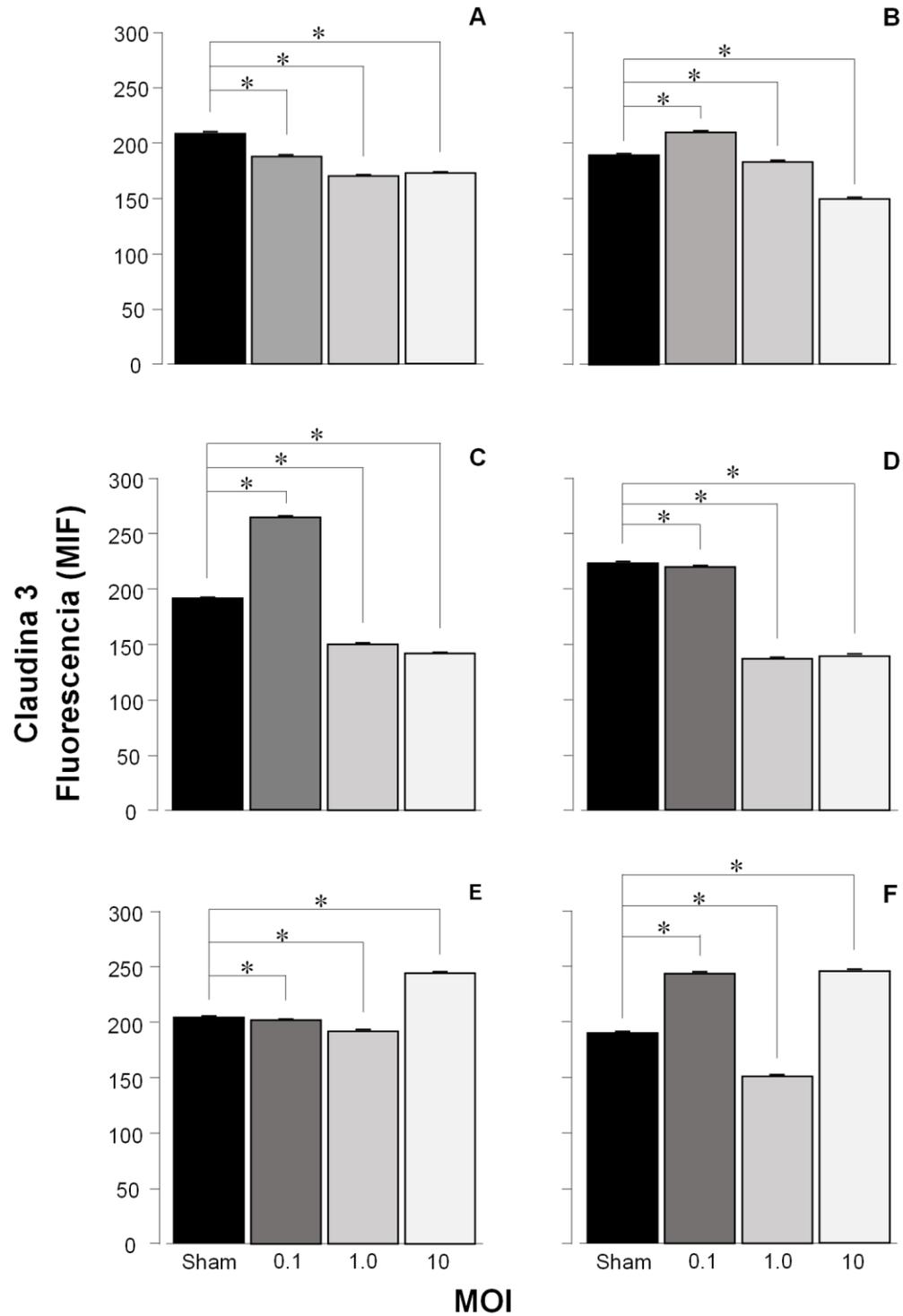


Figura 33. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) en cada tiempo (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en la subpoblación 1 (SP1) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min; **B.** Expresión a 1h; **C.** Expresión a 3 h; **D.** Expresión a 6 h; **E.** Expresión a 12 h; **F.** Expresión a 24 h. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (MIF) en la subpoblación 2 de células HBEC-5i.

En la **Figura 34** se muestra la expresión de la fluorescencia (intensidad media de fluorescencia **MIF**) de la claudina -3 en la SP2 de las células HBEC-5i a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y exposiciones de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI).

Se tiene una reducción a los 30 min post infección en los valores de expresión de fluorescencia a 0.1 MOI (15.78 ± 0.01) y 1.0 (17.2 ± 0.01), teniendo en esta última inoculación viral su valor más bajo. No así con 10 MOI (22.73 ± 0.01), donde se aprecia un incremento y la máxima expresión de claudina -3. Existen diferencias significativas ($*p < 0.01$) al comparar las diferentes MOI con el grupo sham (22.1 ± 0.01) (**Fig. 34 A**).

A 1 h post exposición existe un incremento en la expresión de claudina -3 a 0.1 y 1.0 MOI (**ver cuadro 7**). No obstante, con una MOI de 10 hay una reducción y se muestra el valor más bajo. Se tienen diferencias significativas entre las diferentes MOI virales y el grupo sham (**Fig. 34 B**).

En la **Fig. 34 C** a las 3 h posteriores a la inoculación viral se muestra un incremento en la expresión de la claudina -3, teniendo a 10 MOI su valor más alto. Se presentan diferencias significativas al comparar las MOI con el grupo sham (**Cuadro 7**).

Se destaca un aumento en la expresión de fluorescencia a las 6 h posteriores a la infección por ZIKV. A una MOI de 1.0 se tiene el valor más alto de claudina -3. Asimismo, se aprecian diferencias significativas entre las diferentes MOI y el grupo sham (**ver cuadro 7**) (**Fig. 34 D**).

A las 12 h post exposición se tiene un aumento en los valores de fluorescencia. El valor más alto se muestra con una MOI de 1.0 (**Fig. 34 E**). Destaca que al comparar el grupo sham con las diferentes MOI existen diferencias significativas (**Cuadro 7**).

Se presenta una reducción a las 24 h post inoculación en la expresión de claudina -3 con 0.1 y 1.0 MOI (**Cuadro 7**). No obstante, con una MOI de 10 se muestra el valor más alto de fluorescencia. De manera semejante, se aprecian diferencias significativas entre el grupo sham y las MOI virales (**Fig. 34 F**).

A continuación, se presenta el cuadro con los valores de fluorescencia (Intensidad media de fluorescencia MIF) de la SP2 de células HBEC-5i a los diferentes tiempos y MOI.

Cuadro 7. Valores de fluorescencia SP2 (MIF) de la expresión de la claudina -3 por exposición al ZIKV a diferentes diluciones (0.1, 1.0 y 10 MOI) y tiempos (30 min, 1 h, 3h, 6 h, 12 y 24h).

Tiempo	SHAM (% de fluorescencia)	MOI (% de fluorescencia)		
		0.1	1	10
30 min	22.1±0.01	15.8±0.01	17.2±0.01	22.7±0.01
1 h	19.6±0.01	24.9±0.01	26.4±0.02	11.9±0.02
3 h	18.9±0.21	19.9±0.01	23.9±0.02	26.8±0.006
6	17.0±0.02	19.1±0.01	29.8±0.01	27.7±0.006
12	16.8±0.01	21.7±0.006	27.8±0.01	21.7±0.006
24	21.3±0.01	20.4±0.02	19.2±0.02	26.9±0.01

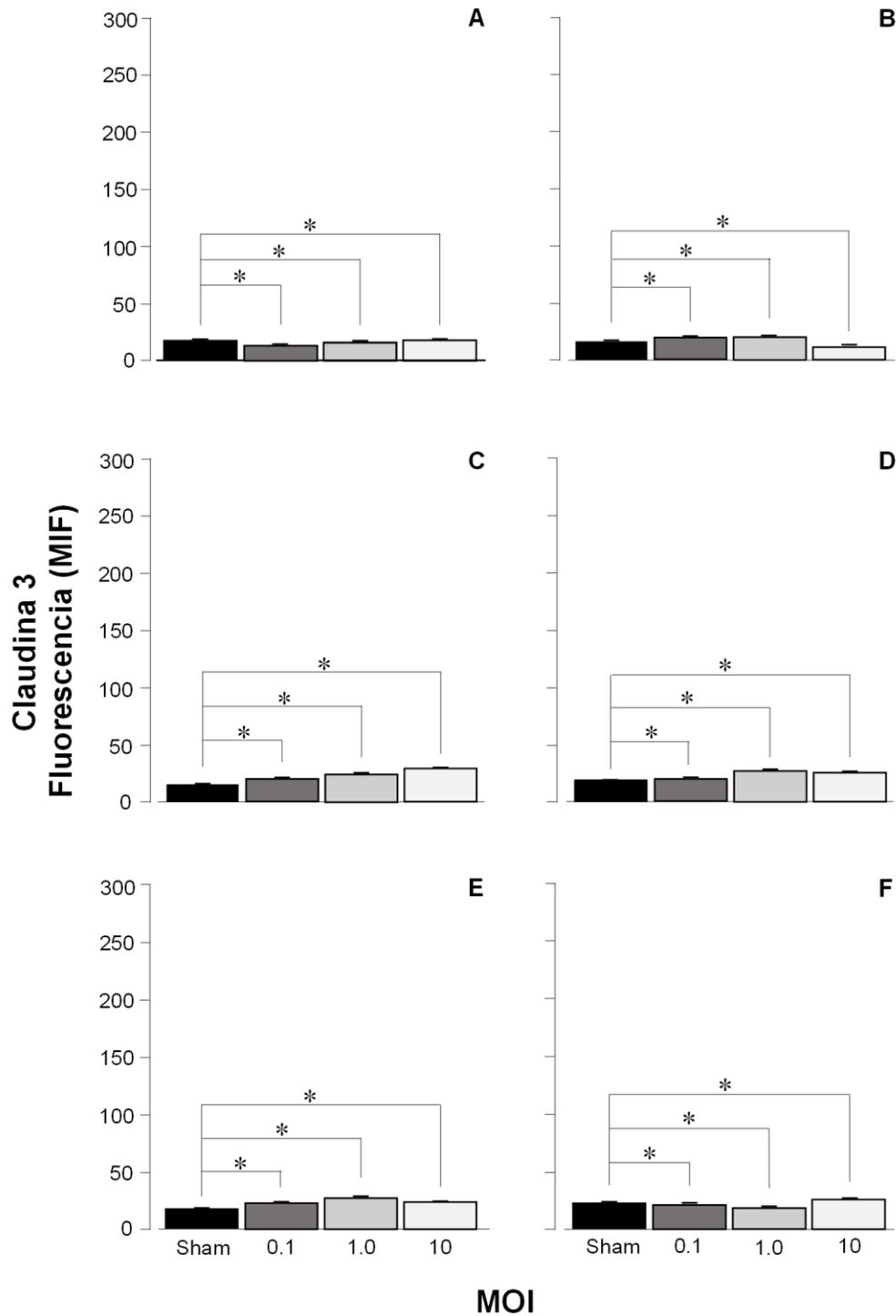


Figura 34. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) en cada tiempo (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en la subpoblación 2 (SP2) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min; **B.** Expresión a 1h; **C.** Expresión a 3 h; **D.** Expresión a 6 h; **E.** Expresión a 12 h; **F.** Expresión a 24 h. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (MIF) en células HBEC-5i en el tiempo.

En la **Figura 35** se presenta la expresión de la claudina -3 por fluorescencia (Intensidad media de fluorescencia MIF) a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en las células HBEC-5i.

Con una exposición viral de 0.1 MOI (**Fig. 35 A**) se muestran fluctuaciones en los valores de fluorescencia a los diferentes tiempos. A los 30 min post infección se aprecia el valor más reducido de expresión, mientras que a las 24 h se tiene el mayor aumento. Existen diferencias significativas ($*p<0.01$) entre los diferentes tiempos y el grupo sham.

De una manera similar, se aprecian fluctuaciones en la expresión de claudina -3 con una MOI de 1.0 (**Fig. 35 B**). A las 6 h post inoculación se aprecia el valor más alto; sin embargo, a las 24 h se tiene una reducción y el valor más bajo de expresión. Se muestran diferencias significativas entre el sham y los tiempos.

Se muestra igualmente, que existen fluctuaciones con 10 MOI en la expresión de la proteína. A 1 h post exposición se aprecia el valor más bajo, mientras que, a las 6 horas hay un aumento y se presenta la máxima expresión (**Fig. 35 C**). Se destaca que también hay diferencias significativas al comparar el grupo sham y los diferentes tiempos.

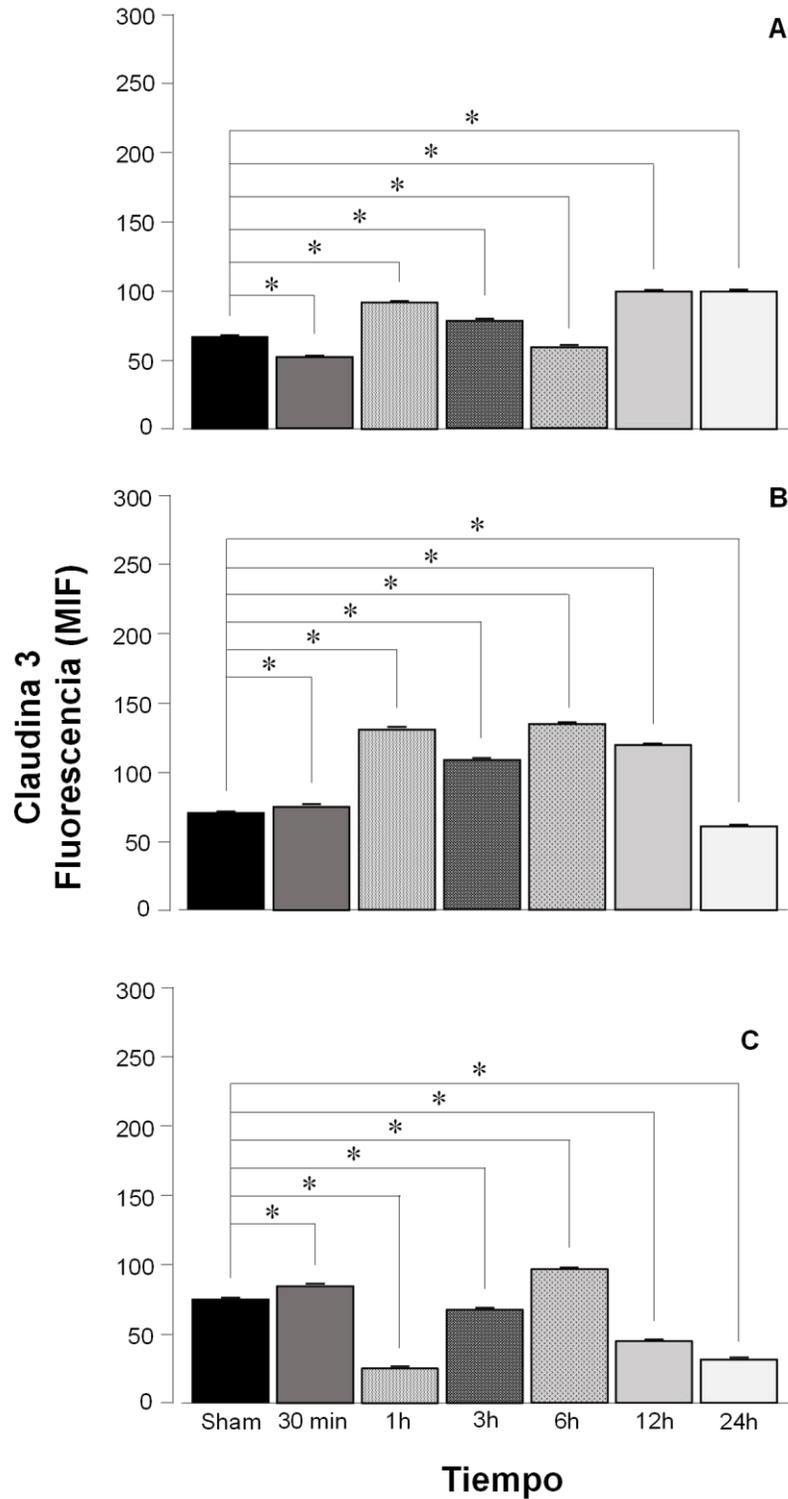


Figura 35. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por cada MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI; **B.** Expresión con 1 MOI; **C.** Expresión con 10 MOI. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (MIF) en la subpoblación 1 de células HBEC-5i en el tiempo.

Se aprecia en la **Figura 36** la expresión de la fluorescencia de la claudina -3 en la SP1 a los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y MOI de ZIKV (0.1, 10 y 10) en células HBEC-5i.

Con una inoculación viral de 0.1 MOI se aprecian fluctuaciones en la expresión de fluorescencia a los diferentes tiempos. A los 30 min post infección se muestra el mayor decremento, mientras que a las 3 h se muestra la expresión máxima (**Fig. 36 A**). Existen diferencias significativas ($*p<0.01$) al comparar el grupo sham y los diferentes tiempos.

En la **Fig. 36 B** a una concentración viral de 1.0 MOI, se presenta de la misma manera, una fluctuación en los valores de claudina -3. A las 6 horas post exposición con ZIKV se observa el valor más reducido, mientras que a las 12 h el más alto. Se observan también diferencias significativas al comparar el sham y con los diversos tiempos.

Existe de manera semejante, con una MOI de 10, una fluctuación en la fluorescencia. Se destaca que, a las 3 h posteriores a la inoculación viral se muestra la mayor disminución de expresión. En contraste, a las 12 h se tiene el valor máximo (**Fig. 36 C**). Aunado a esto, hay diferencias significativas al comparar los diferentes tiempos con el grupo sham.

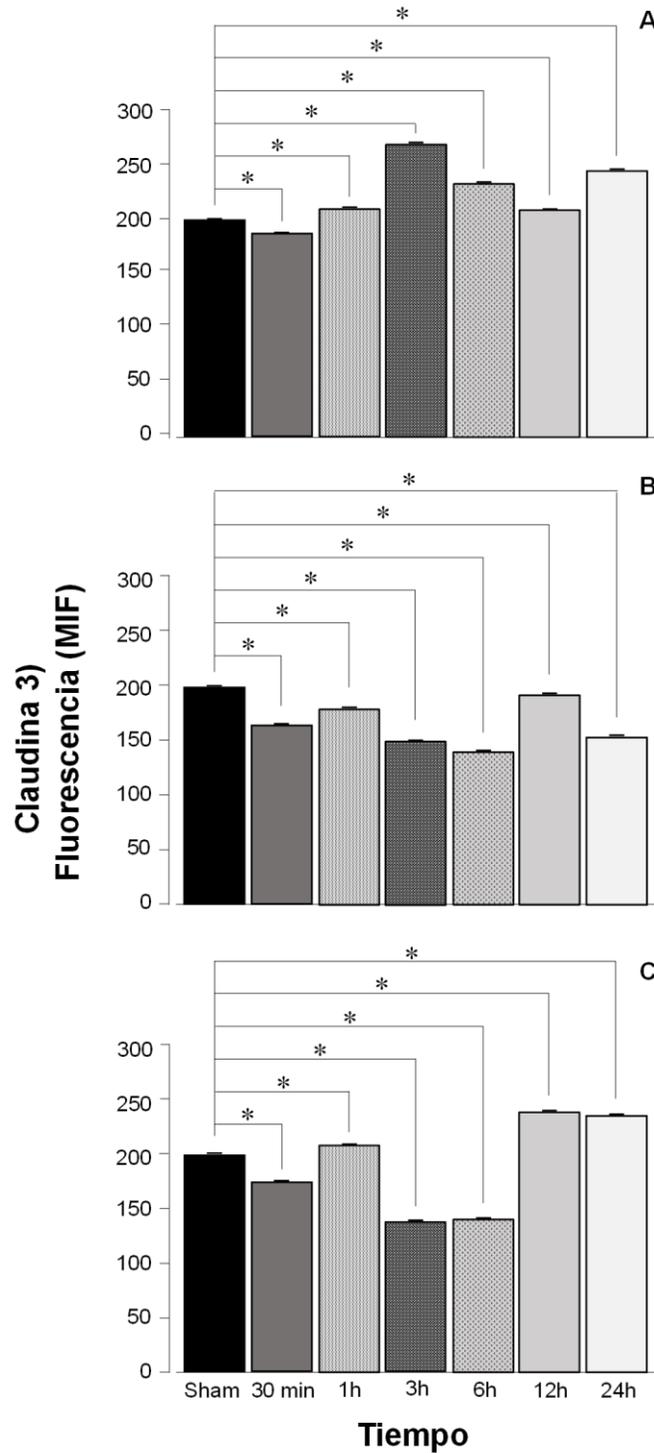


Figura 36. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por cada MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en la subpoblación 1 (SP1) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI; **B.** Expresión con 1 MOI; **C.** Expresión con 10 MOI. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de claudina -3 (MIF) en la subpoblación 2 de células HBEC-5i en el tiempo.

Se presenta a continuación en la siguiente figura (**Fig. 37**) la expresión de la fluorescencia en la SP2 a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en células HBEC-5i.

En la **Fig. 37 A** con una concentración viral de 0.1 MOI, se presentan fluctuaciones en los valores de fluorescencia, destacando que a 1 h se presenta el mayor aumento. Se muestran diferencias significativas (* $p < 0.01$) entre el grupo sham y los diferentes tiempos de inoculación con ZIKV.

De manera similar, con una MOI de 1.0, se muestran fluctuaciones en la expresión de claudina -3 (**Fig. 37 B**). A los 30 min post infección se presenta el valor más reducido, mientras que a las 6 h se tiene el más alto. Existen también diferencias significativas al comparar el grupo sham y los tiempos establecidos.

Con una exposición de 10 MOI se observan fluctuaciones en la fluorescencia. A 1 h post inoculación con el virus se tiene la máxima reducción; sin embargo, a las 6 h se tiene la mayor fluorescencia (**Fig. 37 C**) Se presentan diferencias significativas entre los diferentes tiempos de infección viral con respecto al sham.

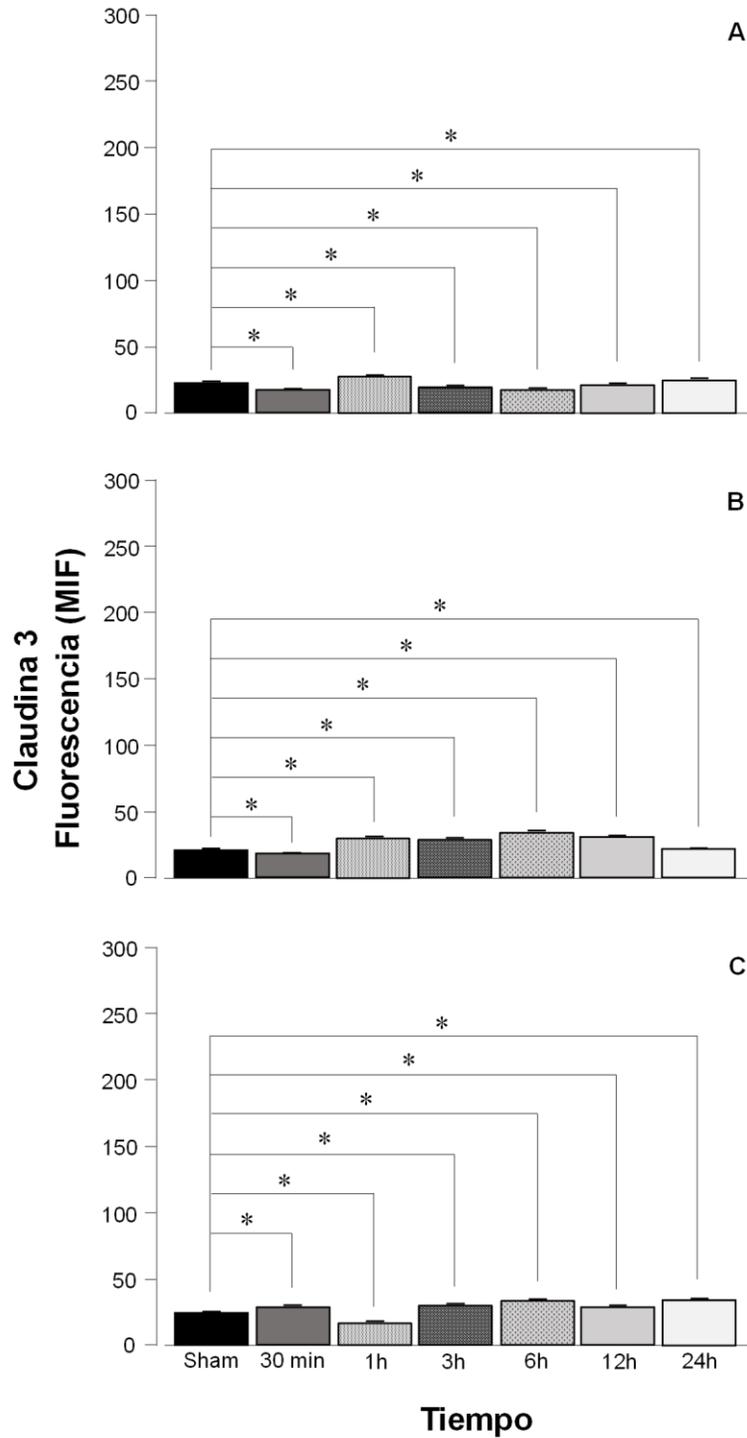


Figura 37. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) a diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) por cada MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en la subpoblación 2 (SP2) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI; **B.** Expresión con 1 MOI; **C.** Expresión con 10 MOI. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $*p < 0.01$. $n=3$.

Expresión de la claudina -3 (% de Gates) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2).

En la **Figura 38** se muestra la expresión de la claudina -3 en términos de fluorescencia (% de Gates) comparando las dos subpoblaciones (SP1 y SP2) en las células HBEC-5i a las diferentes exposiciones de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI) y tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

Se observa en la **Fig. 38 A** a los 30 min post inoculación, la comparación entre las dos subpoblaciones celulares. En la SP1 se aprecia una reducción en la fluorescencia, en contraste con la SP2, donde se muestra un aumento de esta. Se destaca que con 10 MOI se presenta el valor más reducido de expresión en la SP1, no así, en la SP2 donde se presenta su valor más alto. Aunado a esto, existen diferencias significativas al comparar estas dos subpoblaciones entre sí (* $p < 0.001$).

De manera similar, existen diferencias entre las dos subpoblaciones celulares en la expresión de claudina -3 (**Fig. 38 B**). Al tiempo de 1h post exposición, se muestra en la SP1 un decremento en la fluorescencia, de manera opuesta, en la SP2 se aprecia un incremento. El valor más reducido de expresión en SP1 se presenta con 10 MOI, de la misma manera ocurre en SP2. No obstante, se observa la mayor fluorescencia a 1.0 MOI en SP2. Hay diferencias significativas al realizar la comparación entre ambas.

A las 3 horas posteriores a la infección, también se observan diferencias en la expresión de fluorescencia en ambas subpoblaciones. En la SP1, se presenta una reducción, no así en SP2, donde se presenta un aumento. Cabe mencionar que

en la SP1 se tiene el valor más reducido de expresión con 10 MOI. En la SP2 el valor máximo se presenta con una MOI de 1.0 (**Fig. 38 C**). Existen, además diferencias significativas al comparar las dos subpoblaciones.

En la **Fig. 38 D**, a las 6 h post inoculación, se observan diferencias en la expresión de claudina -3 entre las dos subpoblaciones. Destaca que, en la SP1 hay un aumento con una MOI de 0.1; sin embargo, con 1.0 MOI se tiene la mayor reducción de fluorescencia. De forma contraria, en la SP2 a esta exposición viral, se aprecia su máxima expresión. Se muestran diferencias significativas en los valores de fluorescencia al comparar entre sí a las dos subpoblaciones.

A las 12 horas post infección, hay diferencias en la fluorescencia de la claudina -3 en las subpoblaciones celulares. En SP1 ocurre un decremento en la expresión, mientras que en SP2 ocurre lo contrario. El valor más bajo en SP1 se muestra con 10 MOI, de la misma manera, en SP2. Se presenta con 1.0 MOI el valor máximo de fluorescencia en SP2 (**Fig. 38 E**). Entre las dos subpoblaciones se observan diferencias significativas.

Existen diferencias a las 24 h post exposición al virus en las subpoblaciones de HBEC-5i. Se muestra en ambas, que la fluorescencia disminuye a una MOI mayor. La mayor reducción se presenta en SP1 y SP2 con una MOI de 10, mientras que la expresión mayor se aprecia con 1.0 MOI en SP2 (**Fig. 38 F**). Se muestran diferencias significativas en ambos grupos en la expresión de claudina -3.

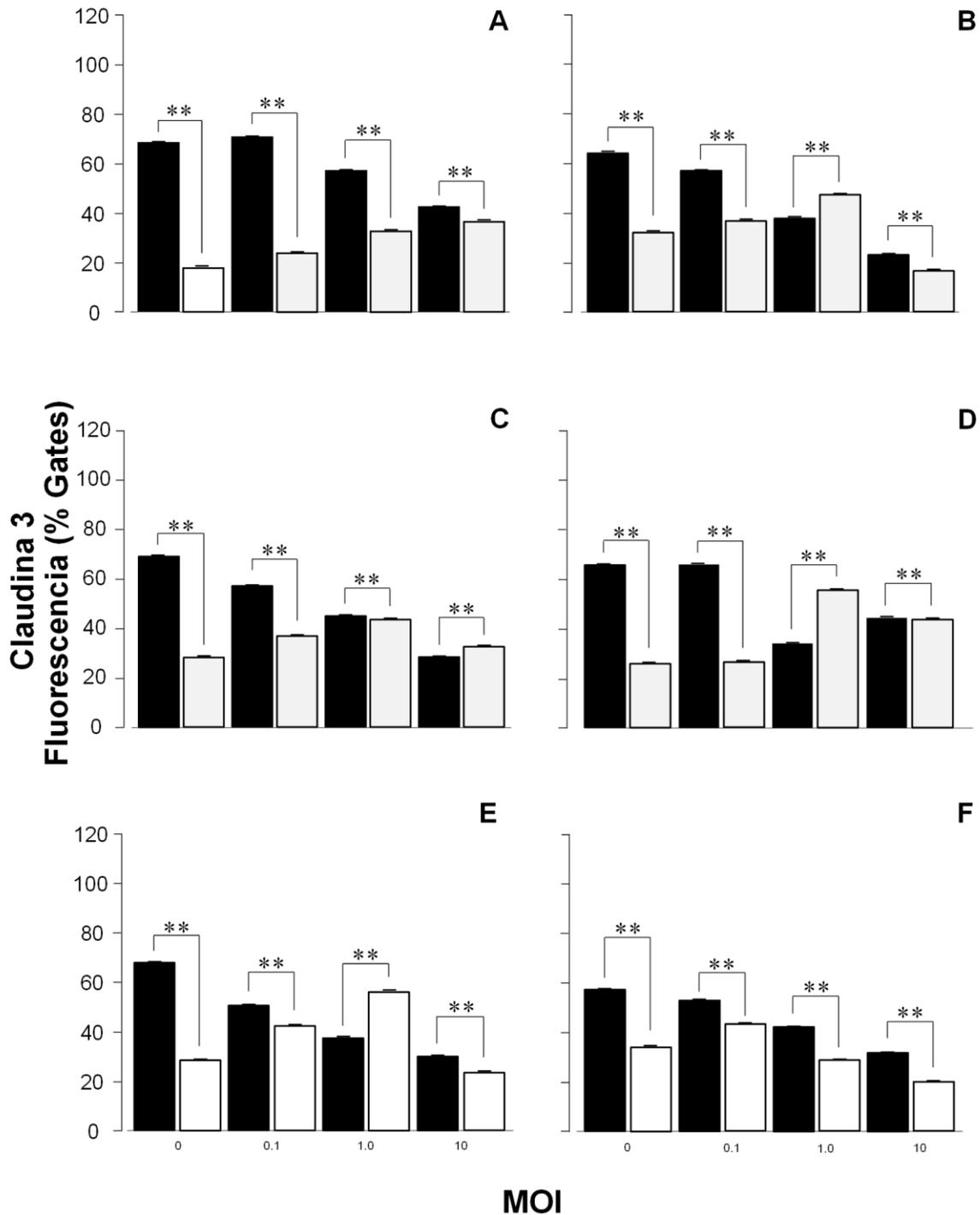


Figura 38. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (% de Gates) a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) y diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) comparando ambas subpoblaciones 1 (SP1) y 2 (SP2) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min; **B.** Expresión a 1 hora; **C.** Expresión a 3 horas. **D.** Expresión a 6 horas. **E.** Expresión a 12 horas. **F.** Expresión a 24 horas. Prueba t de Student Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $**p < 0.001$. $n=3$.

Expresión de la claudina -3 (MIF) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2).

En la siguiente figura (**Fig. 39**) se muestra la expresión de la claudina -3 por fluorescencia (MIF), comparando las dos subpoblaciones (SP1 y SP2) en las células HBEC-5i a las diferentes exposiciones de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI) y diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

Se observan a los 30 min post inoculación, diferencias en la fluorescencia entre la SP1 y SP2 (**Fig. 39 A**). En ambas subpoblaciones se aprecia una reducción en la expresión de la claudina -3. Se destaca que en SP1 con 1.0 MOI, se presenta el valor más reducido, mientras que en SP2, con 10 MOI se tiene la mayor expresión. Existen diferencias significativas (** $p < 0.001$) al comparar los valores de fluorescencia de ambas subpoblaciones entre sí.

De manera similar, hay diferencias a 1 h post infección en la expresión de la proteína en las dos subpoblaciones celulares (**Fig. 39 B**). Se aprecia en SP1 un incremento en la fluorescencia con 0.1 MOI, no obstante, con 10 MOI se tiene la mayor reducción. No así, en SP2, donde se observa un incremento en la expresión de claudina -3, presentando con 1.0 MOI su valor máximo y con 10 MOI la mayor disminución.

En la **Fig. 39 C**, a las 3 horas, se observan también, diferencias entre SP1 y SP2 en la expresión de claudina -3. Se presenta en SP1 un decremento de la fluorescencia, mostrando su mayor reducción a 10 MOI; sin embargo, se destaca que existe un aumento y su máxima expresión a 0.1 MOI. De manera opuesta, en SP2 se presenta un incremento en la expresión de la proteína, siendo a 10 MOI

donde se tiene su valor más alto. Se muestran diferencias significativas entre SP1 y SP2.

A las 6 h posteriores a la exposición al ZIKV, se muestran de manera semejante, diferencias entre la fluorescencia de las dos subpoblaciones celulares. Se aprecia en SP1 una disminución en la expresión de claudina -3, presentando a 1.0 MOI su mayor disminución. Contrariamente, en la SP2 se observa un incremento, teniendo su valor más alto a 1.0 MOI. Existen además diferencias significativas en la fluorescencia entre ambas subpoblaciones (**Fig. 39 D**).

De la misma manera, existen a las 12 horas post inoculación diferencias en la fluorescencia en SP1 Y SP2. Se observa en SP1, una reducción en su expresión y el valor más bajo a 1.0 MOI. No obstante, con una MOI de 10, se aprecia un incremento y la máxima expresión de claudina -3. Para SP2, se describe un aumento en los valores de fluorescencia, siendo a una MOI de 1.0 donde se presenta su valor más alto. En ambas subpoblaciones se presentan diferencias significativas al compararlas (**Fig. 39 E**).

Se presentan también a las 24 h, diferencias entre SP1 y SP2 en los valores de claudina -3. Se observa en SP1, un aumento en su expresión, mostrando a 10 MOI su mayor expresión. Destaca que el valor más reducido se aprecia con una MOI de 1.0, lo que coincide con el comportamiento de la fluorescencia en SP2 (**Fig. 39 F**). Se observan diferencias significativas al comparar a SP1 y SP2.

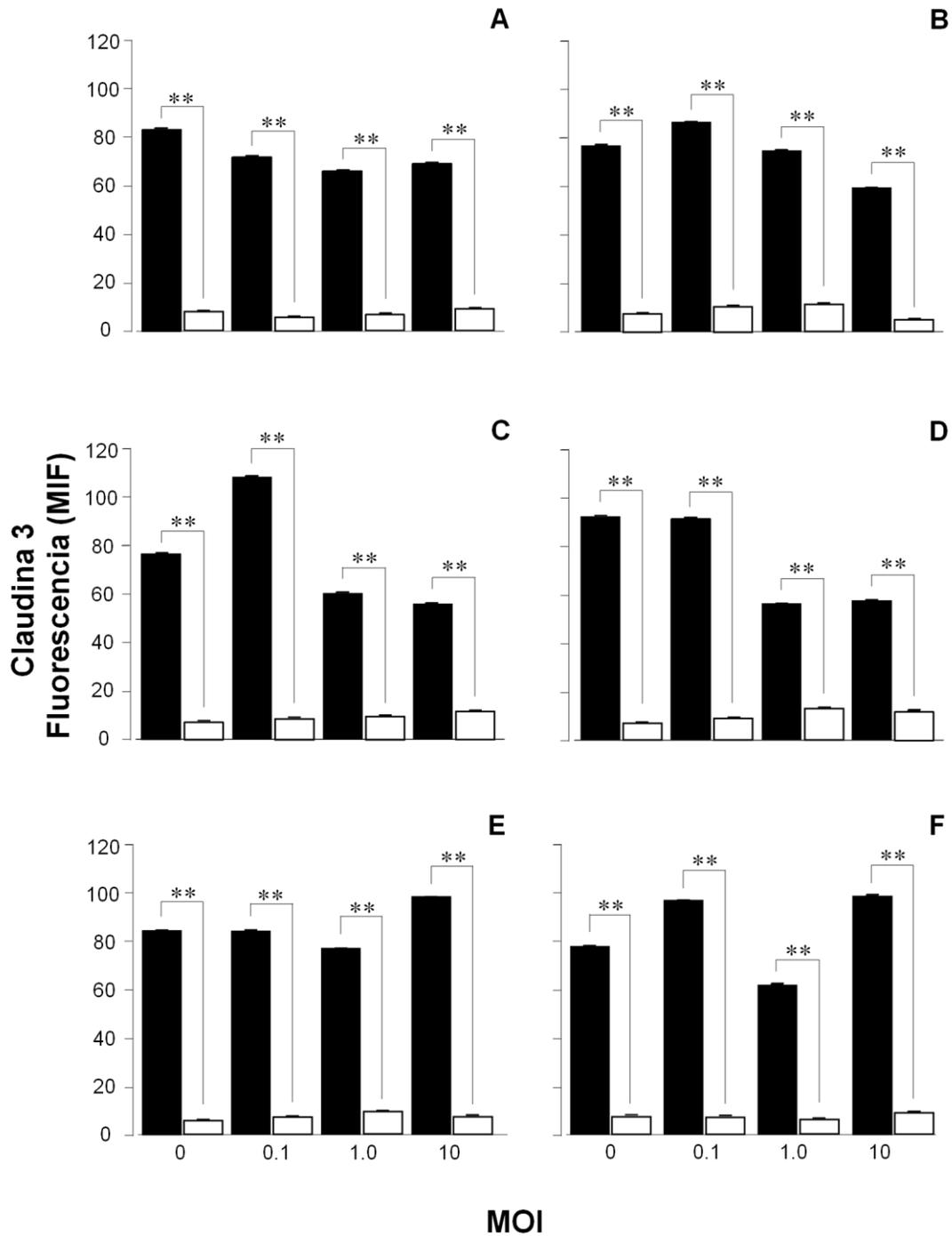


Figura 39. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) a diferentes MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) y diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) comparando ambas subpoblaciones 1 (SP1) y 2 (SP2) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión a 30 min; **B.** Expresión a 1 hora; **C.** Expresión a 3 horas. **D.** Expresión a 6 horas. **E.** Expresión a 12 horas. **F.** Expresión a 24 horas. Prueba t de Student. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $**p < 0.001$. $n=3$.

Expresión de la claudina -3 (% de Gates) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2) respecto al tiempo.

En la **Figura 40** se observa la expresión de claudina -3 por fluorescencia (% Gates) a los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y exposiciones de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI), al comparar las dos subpoblaciones celulares (SP1 y SP2) de la línea celular HBEC-5i.

Se muestra con 0.1 MOI una fluctuación en la expresión de fluorescencia a los diferentes tiempos en las dos subpoblaciones celulares (SP1 y SP2) (**Fig. 40 A**). En SP1 el valor más alto de fluorescencia se aprecia a 30 min post exposición, mientras que el más reducido a las 24 h. En la SP2, por el contrario, se presenta el mayor aumento a las 24 h y el valor más bajo a los 30 min post inoculación. Existen diferencias significativas al comparar a SP1 y SP2 a los diferentes tiempos (* $p < 0.001$)

De la misma manera, con 1.0 MOI se presentan fluctuaciones en la expresión de claudina -3 en SP1 y SP2 a todos los tiempos. En SP1, se aprecia el valor más alto en el grupo sham, mientras que el más reducido se observa a las 6 h post infección con ZIKV. Para la SP2, el mayor incremento se tiene a las 12 h y su valor más bajo a los 30 min. Se muestran además diferencias significativas entre las dos subpoblaciones con respecto a la expresión de claudina -3 (**Fig. 40 B**)

Existe también, con una exposición a 10 MOI una fluctuación en la fluorescencia a los distintos tiempos establecidos (**Fig. 40 C**). La mayor expresión en SP1, se observa en el grupo sham, mientras que su valor más reducido se

presenta a 1 h posterior a la inoculación viral. En SP2, la máxima expresión se muestra las 6 h y su mayor reducción a 1 h. De manera similar, existen diferencias significativas en la expresión de claudina -3 al comparar ambas subpoblaciones.

En la **Fig. 40 C** a 10 MOI se muestra una disminución en la expresión de fluorescencia de la claudina -3 en ambas subpoblaciones celulares. Se presentan diferencias significativas entre SP1 y SP2. El valor más bajo en SP1 y SP2 se presenta a 1 h post infección por ZIKV.

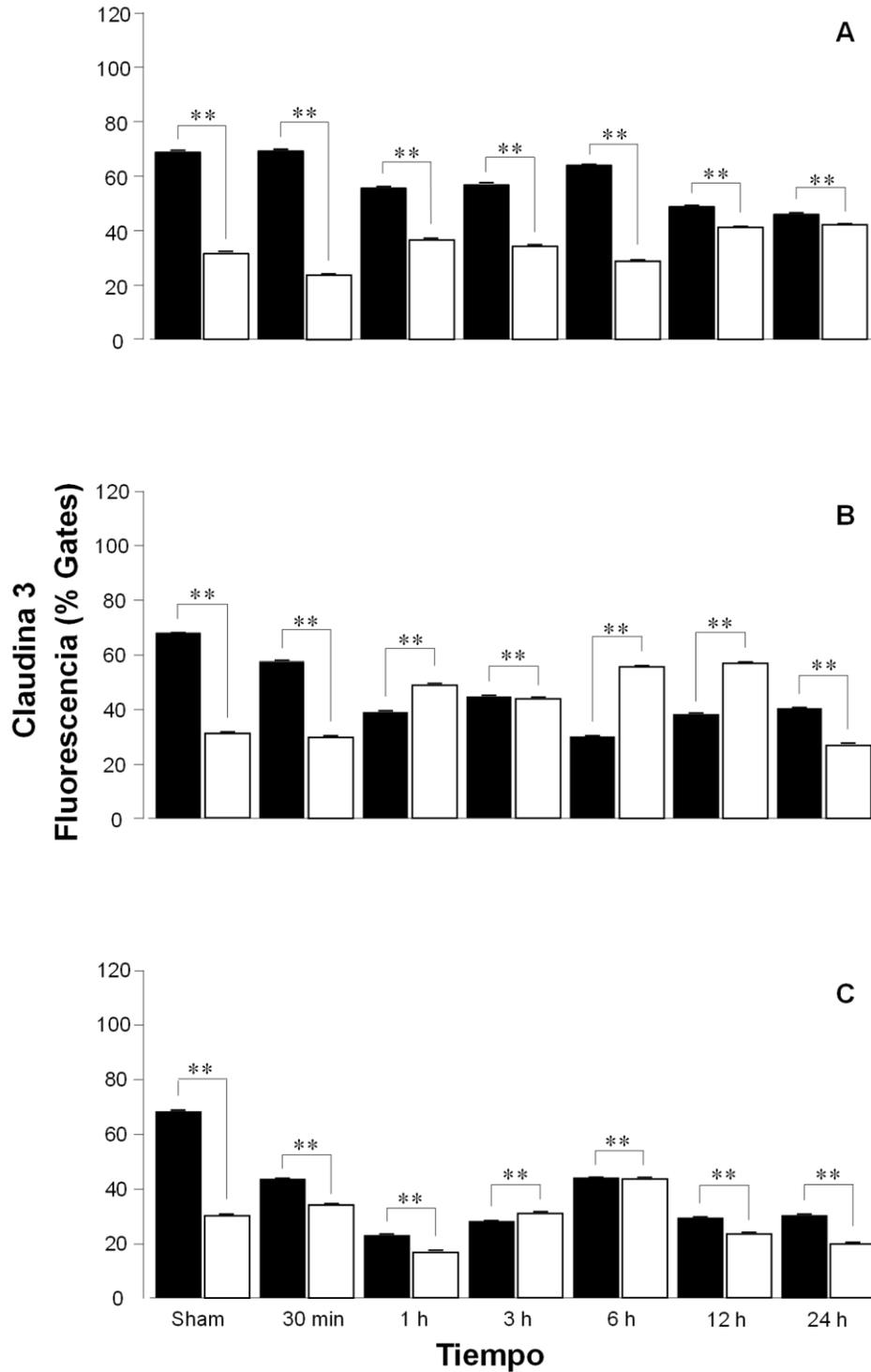


Figura 40. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (% Gates) a los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) comparando ambas subpoblaciones 1 (SP1) y 2 (SP2) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI; **B.** Expresión con 1.0 MOI; **C.** Expresión con 10 MOI. Prueba t de Student. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor ** $p < 0.001$. $n = 3$.

Expresión de la claudina -3 (MIF) en las subpoblaciones (SP1) y (SP2) respecto al tiempo

Se aprecia en la **Figura 41** la expresión de la claudina -3 por fluorescencia (MIF) a los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y MOI de ZIKV (0.1, 1.0 y 10) en las 2 subpoblaciones (SP1 y SP2) de células HBEC-5i.

En la **Fig. 41 A**, a 0.1 MOI, se muestran fluctuaciones en la expresión de claudina -3 a los diferentes tiempos, en las subpoblaciones SP1 y SP2. Se presenta en SP1 la máxima expresión a las 3 h post infección con ZIKV, mientras que su valor más bajo se observa a los 30 min. En la SP2, se tiene el valor más alto a 1 h y su mayor reducción también se da a los 30 min. Se pueden apreciar diferencias significativas en la fluorescencia al comparar ambas subpoblaciones.

De manera semejante, se presentan fluctuaciones con 1.0 MOI en los valores de fluorescencia (**Fig. 41 B**). En la SP1, se presenta el valor máximo en el grupo sham, mientras que su mayor reducción se aprecia a las 6 h post exposición, no obstante, en este tiempo se tiene el valor más alto en SP2. Además, el valor más reducido de expresión se presenta a los 30 min. Existen diferencias significativas entre SP1 y SP2 en la expresión de claudina -3 (* $p < 0.001$).

A una MOI de 10, se presentan también fluctuaciones en la fluorescencia de la claudina -3, a los diferentes tiempos. Para la SP1, la mayor expresión de la proteína se muestra a las 12 h, mientras que el valor más bajo a las 3 h.

La fluorescencia más alta en SP2, se observa a las 6 h y su mayor reducción se aprecia a 1 h (**Fig. 41 C**). Se observan diferencias significativas en la expresión de claudina -3 al comparar entre sí a SP1 y SP2.

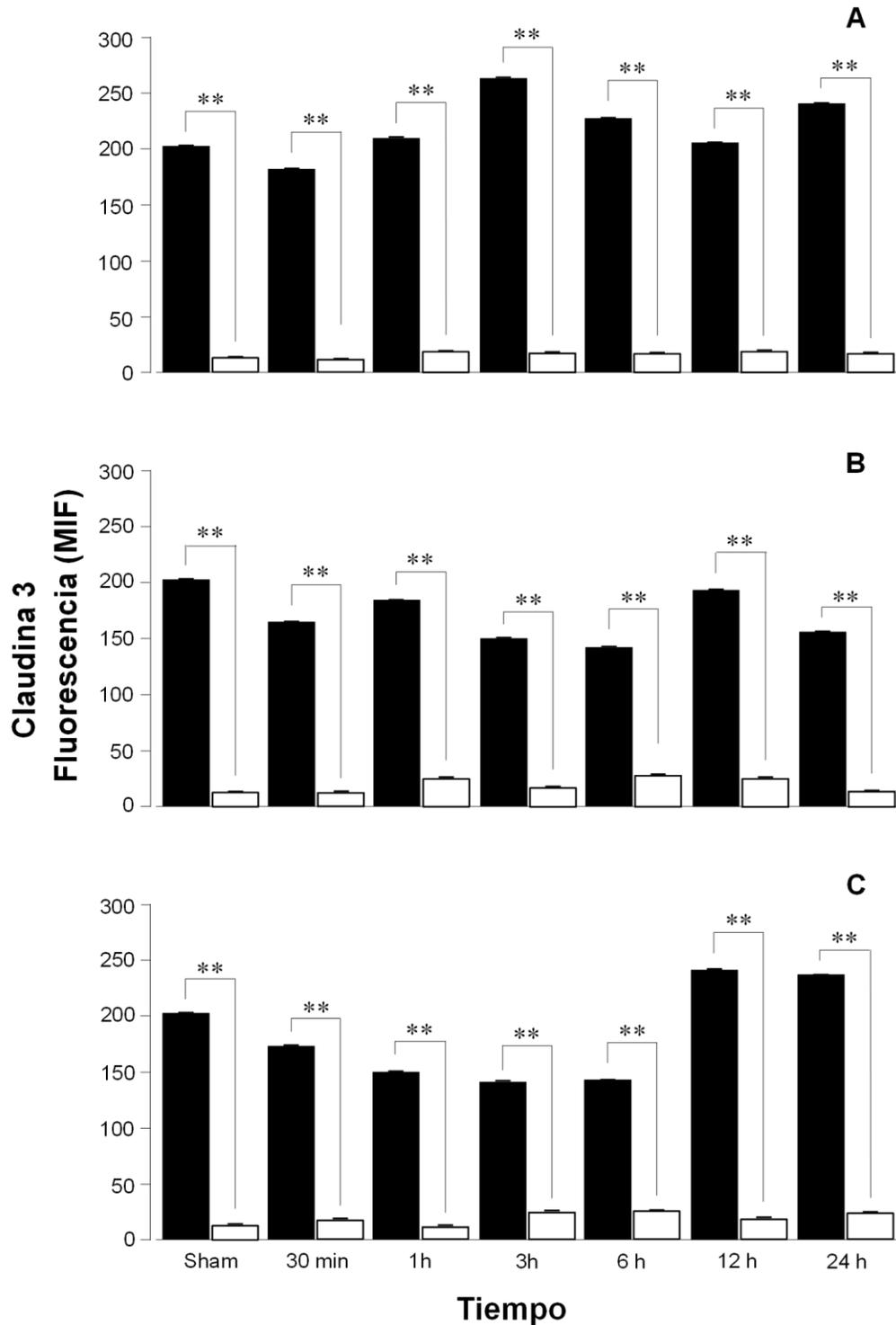


Figura 41. Expresión de claudina -3 por fluorescencia (MIF) a los diferentes tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h) y exposiciones de ZIKV (0.1, 1.0 y 10 MOI) comparando ambas subpoblaciones 1 (SP1) y 2 (SP2) en las células endoteliales HBEC-5i. **A.** Expresión con 0.1 MOI. **B.** Expresión con 1.0 MOI. **C.** Expresión con 10 MOI. Prueba t de Student. Los valores están representados por la media \pm EE. El valor $**p < 0.001$. $n=3$.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó la expresión de la claudina -3 en las células endoteliales de cerebro humano (HBEC-5i) infectadas con diferentes MOI de ZIKV MR-766 (0.1, 1.0 y 10) a diversos tiempos (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

Se utilizó la cepa MR-766, que es la más importante del linaje africano, debido a su alta virulencia, afinidad a las células componentes de cerebro y presenta mayor eficiencia de infección comparada con el linaje asiático (21, 29).

Nuestros resultados, mostraron que la cepa MR-766 infecta de manera eficiente a las células HBEC-5i por la observación de su efecto citopático. Esto coincide con los trabajos de Shao *et al.* (2017), Leda *et al.* (2019) y Clé *et al.* (2020), donde describen que la cepa MR-766 tiene una mayor neuroinvasividad, por lo tanto, causa mayor daño en el SNC (29, 116, 142).

Diversos estudios comprueban que una infección viral modifica la expresión de las claudinas, como principales componentes de las TJs (139, 144, 145). Aunque es hasta el año 2007 cuando se reconoció la participación de las claudinas en el ingreso del virus a las células (131).

En las TJs de las células endoteliales cerebrales, las principales claudinas presentes son la -1, -3 y -5, si bien también se ha reportado la presencia de la claudina -12 y -25, aunque se desconoce claramente su función (131).

La claudina -5 es la claudina que ha sido más estudiada y descrita en la literatura, debido a que su expresión es casi 10 veces mayor que la de otras claudinas en el endotelio de los microvasos cerebrales (146). El decremento de la

claudina -5 se relaciona con desórdenes neurodegenerativos como Alzheimer, esclerosis múltiple y otros padecimientos neuroinflamatorios (147-149). Del mismo modo, la infección por virus HIV produce un decremento de la expresión de la claudina -5 en células endoteliales de cerebro (150).

La presencia de la claudina -1 está íntimamente relacionada con procesos patológicos como accidentes cerebrovasculares y en procesos inflamatorios (151-153), mientras que en condiciones normales la presencia y la función de la claudina -1 no está completamente determinada. Che *et al.* (2013) mostraron que la claudina-1 es el principal componente estructural involucrado en la entrada del virus de dengue en células linfocíticas humanas (144). La infección por el virus Nilo Occidental incrementa la expresión de la claudina -1 en las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (111).

La presencia de la claudina -3 ha sido muy debatida en repetidas ocasiones. Algunos autores han sugerido que no es un componente esencial en la BHE (102). Steinemann *et al.* (2016) y Días *et al.* (2019) sugieren la ausencia de la expresión de la claudina -3 en los microvasos cerebrales humanos, por lo que no contribuye en la estructura de la BHE (102, 148). Mientras que otros autores, han determinado su presencia en microvasos cerebrales y en algunas líneas celulares endoteliales donde incluso la presentan como un marcador potencial de la integridad de la BHE en diversas patologías en el SNC (98, 99).

Wolburg *et al.* (2002) y Berndt *et al.* (2018) sugieren que la claudina -3 está presente en los microvasos cerebrales y que su expresión disminuye como consecuencia de diversas patologías del SNC (96, 99).

Del mismo modo, otros autores sugieren que la claudina -3 puede estar involucrada como un elemento importante en la inducción y el mantenimiento de la BHE, en el mantenimiento de la homeostasis y las propiedades de barrera de células endoteliales cerebrales de humano (98, 101, 105, 106, 108). Estas diferencias pueden deberse posiblemente a que la claudina -3 ha sido identificada como claudina -1 de manera equivocada, debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados (88, 99). Otra causa posible, es que la expresión de la claudina -3 está disminuida en procesos patológicos e inflamatorios del SNC (98, 99). También hacen mención de su pérdida *in vitro* como consecuencia de un gran número de pases realizados en los cultivos celulares (101, 106).

Algunos autores, proponen que la presencia de la claudina -3 está limitada al epitelio de los plexos coroideos en humano y roedores (102, 146).

La expresión de la claudina -3 en procesos infecciosos virales ha sido muy poco estudiada. En la infección por rotavirus en células endoteliales de riñón se reporta la modificación del patrón de distribución de la claudina -3 (154).

Uno de los hallazgos más destacados en nuestro trabajo fue confirmar la expresión de la claudina -3 en las células HBEC-5i. Por esta razón, proponemos que la claudina -3 sí es un elemento que conforma a las TJs de las células endoteliales de cerebro humano. También pudimos observar que en los grupos controles y al tiempo de 30 min post infección, la claudina -3 se localizó hacia los bordes de las células; sin embargo, en los tiempos posteriores se aprecia en el citosol, lo que podría sugerir la síntesis de esta claudina en mayor cantidad ante la presencia del ZIKV. Esto podría explicarse como un posible mecanismo celular de

compensación donde se buscó mantener la homeostasis y la función de barrera ante la pérdida de la expresión de otras claudinas. Esto coincide con los resultados obtenidos por algunos autores, donde se reporta su presencia en la BHE de humano y de ratón, e incluso se considera como un componente importante de la BHE que podría ayudar a compensar la pérdida o ausencia de la claudina -5 durante procesos patológicos en el SNC (101, 105, 106).

Este es el primer trabajo de investigación, donde los resultados muestran la presencia y el decremento de la claudina -3 en HBEC-5i infectadas por el ZIKV.

La expresión de la claudina -3 está reducida y es dependiente de las MOI virales de ZIKV MR-766 (0.1, 1.0 y 10) y del tiempo de exposición en las células HBEC-5i. Nuestra propuesta, está enfocada en que la ausencia de la claudina -3 pudiese provocar una apertura en los espacios paracelulares entre las células endoteliales cerebrales, que sugeriría una disrupción de la integridad de la capa celular de HBEC-5i.

En otros trabajos se muestra que cepas diferentes del ZIKV no modifican la permeabilidad y la TEER de las células endoteliales cerebrales de humanos y de ratón, concluyendo que no existe disrupción en la BHE (105, 132, 133). Sugiriendo que una disrupción no necesariamente se presenta ante una infección viral por ZIKV. Esto podría ser debido a que el mecanismo de ingreso del ZIKV a la célula fuese por la vía conocida como Caballo de Troya, donde las células inmunes sistémicas son infectadas y esta activación induce el paso por diapédesis al parénquima cerebral (155) y no por la disrupción de la BHE y/o la pérdida en la expresión de las claudinas que constituyen las uniones estrechas.

En este trabajo, no evaluamos los posibles mecanismos que pudieran estar participando en este proceso infeccioso. Sin embargo, se ha determinado que el ZIKV induce la producción exacerbada de citocinas proinflamatorias que conducen a mayor muerte celular en procesos infecciosos (142, 156).

De igual forma, estas diferencias en los trabajos de investigación, pueden ser resultado de los tipos de las líneas celulares utilizadas en los modelos de BHE, de la variación en los tiempos de infección, los tipos de cepas de ZIKV (MEX144, PRVABC59, PE243, etc.) y la carga viral (MOI), entre otros.

Dentro de nuestros resultados por citometría de flujo, se destaca que la línea celular HBEC-5i presentó dos tipos de respuesta con respecto a la expresión de la claudina -3 ante la infección por el ZIKV MR-766 (**ver anexo VI**). En las gráficas dotplot, la población celular se dividió en dos grupos con una emisión diferente de fluorescencia a los diferentes tiempos lo que nos permite sugerir que se trataba de dos tipos de subpoblaciones (SP1 y SP2). En la subpoblación SP1, se observó un decremento en la expresión de la claudina -3 en presencia del ZIKV a diferentes tiempos de exposición. Es posible que este decremento de la expresión pueda estar relacionado con la inhibición de la síntesis de las proteínas celulares durante la producción de las proteínas virales y que esto pueda generar una mayor permeabilidad del endotelio. También observamos que se produjo un comportamiento fluctuante en la expresión de claudina -3 a los diferentes tiempos post inoculación que consideramos puede ser dependiente de la fase del ciclo de replicación viral, esto significaría que en la fase menos activa se tiene una mayor actividad celular relacionada con el restablecimiento de la homeostasis ante la

infección por ZIKV y en la fase más activa del ciclo se vería afectada la síntesis y expresión de la claudina -3 por el daño a la célula. Otro factor que podría estar relacionado con las variaciones en la expresión de esta claudina tiene que ver con la modulación por parte del virus, ya que se ha descrito que algunos virus como el CMV, Hepatitis C y dengue tienen la capacidad de modular la expresión de algunas claudinas que son funcionales para su entrada y procesos de replicación (131, 139, 157).

Por otro lado, con una MOI mayor se observa menor expresión de la proteína, lo que podría indicar mayor actividad del virus en las células durante la producción de sus proteínas estructurales y no estructurales, la consecuente replicación viral y el ensamblaje de los viriones, lo que impediría que la célula produzca sus propias proteínas (158). Además del daño producido a la célula durante esta interacción y mayor mortalidad celular.

De manera contraria, la subpoblación SP2 mostró un incremento en la expresión de la claudina -3. Consideramos que, esta diferencia puede relacionarse con una mejor respuesta ante la presencia del ZIKV o a la activación de los mecanismos de compensación celular de una manera más eficiente. Otra posible justificación podría estar relacionada con la cantidad de receptores que se expresan en la superficie celular, por lo que, con una expresión reducida de estos receptores, se tendría mayor resistencia celular a la infección viral. Esto ha sido reportado recientemente para el virus SARS-CoV-2, donde sugieren que la unión de la proteína S del virus al receptor ACE2 de la célula y la infección producida son proporcionales a la cantidad de receptores expresados en la superficie celular, por

lo que una mayor infección se relaciona con un mayor número de receptores disponibles (159).

Destaca que con una MOI de 10 se presenta la mayor reducción de claudina -3, además de fluctuaciones en su expresión a los diferentes tiempos. Esto sugiere que ante un gran número de partículas de ZIKV los receptores celulares, podrían saturarse e impedir su ingreso, por lo que la dinámica de replicación y producción de proteínas virales y viriones se vería atenuada, permitiendo que la respuesta celular sea más eficiente y pueda compensar el daño generado por el virus (13, 139).

Proponemos que las fluctuaciones en la expresión de la claudina -3 pueden deberse a que su expresión es dependiente de la MOI y del tiempo de exposición. Este comportamiento dual y opuesto entre las dos subpoblaciones celulares de HBEC-5i sugiere posibles diferencias en la expresión de receptores de entrada en la superficie de la célula que las haría susceptibles en mayor o menor grado o en la permisividad a la infección por ZIKV y su respuesta antiviral (160). Las células HBEC-5i mostraron permisividad al ZIKV, se observó que no se requirió de una MOI tan alta para observar un CPE. Estos cambios en la morfología de las células y la variabilidad en la expresión de la claudina -3 podrían sugerir que incluso con MOI bajas existe una infección exitosa, lo que las convierte en una población susceptible y permisiva al ZIKV.

Otra propuesta es que las fluctuaciones en la expresión del claudina- 3 pueden estar relacionadas con la alteración e inhibición de algunas vías de señalización celular que son de gran importancia en los procesos de formación,

maduración y mantenimiento de las TJs en la BHE. Tales vías de señalización como la vía Wnt/ β -catenina, podrían resultar afectadas por la interacción entre el ZIKV y la β -catenina e impedir que las proteínas que constituyen estas uniones puedan ser producidas correctamente (107, 108).

Hemos considerado que el efecto de interacción o interplay podría estar participando entre el ZIKV y las células HBEC-5i. Spindler y Hsu (2012) proponen que el interplay entre los virus y las células de la BHE son complejas, debido a que los virus provocan la disrupción del citoesqueleto de la actina que es esencial en el funcionamiento y estructura de la BHE (138). Otros autores, describen que la interacción viral y la disrupción de la BHE, están estrechamente relacionadas debido a los factores virales y la respuesta inmune del hospedero (161).

Liu *et al.* (2009) propone que el virus de la Hepatitis C interactúa con la claudina -1 en hepatocitos y provoca su decremento durante la infección, facilitando la entrada del virus. Igualmente, Tugizo (2021) plantea que los virus pueden cruzar las barreras de los epitelios causando disrupción en las uniones estrechas, que facilitan su diseminación por la vía paracelular (162).

En nuestras muestras de citometría de flujo, no se adicionó EGTA, el cual actúa como disgregante celular, razón por la que hubo presencia de agregados celulares que se observaron en los dotplots. No obstante, con el fin de descartar un error en la interpretación, los resultados se analizaron separando a las células por gates, lo que nos permitió descartar estos grupos celulares diferentes en tamaño y granularidad al resto de las células individuales y no confundirlas con debris o interpretar dichos dobletes, tripletes, etc., con otra población celular diferente a la

HBEC-5i. No se consideró utilizar el EGTA debido a que se trataba de una sola línea celular, no obstante, se recomienda su uso para reducir la heterogeneidad en las muestras.

A partir de estos resultados, determinamos que la presencia de las dos subpoblaciones SP1 y SP2 no está relacionada con la presencia de debris o de agregados celulares (**Anexos IV y V**).

De la misma manera, se descartó a la fluorescencia basal; es decir, la auto fluorescencia, como un factor de confusión para diferenciación de las dos poblaciones. Por lo tanto, se expresa la fluorescencia de la claudina -3. Lo que nos permitió confirmar que la presencia de las dos subpoblaciones no se relaciona con la fluorescencia basal de las células a los diferentes tiempos (**Anexo V**).

La trascendencia y alcance de este trabajo es muy importante, debido a que es la primera vez que se evalúa la expresión de la claudina -3 en las células HBEC-5i infectadas con el ZIKV. Todavía quedan muchas preguntas por resolver, como las interacciones del ZIKV con las células endoteliales cerebrales, desde la evaluación de otras claudinas, ocludina y las diferentes *zonula occludens* que forman las TJs y constituyen la estrechez de la BHE. Del mismo modo, la expresión de las proteínas vinculadas con los procesos inflamatorios que pudieran estar presentándose durante el proceso de infección por el ZIKV.

Las limitantes del presente trabajo incluyen la no realización de tinciones dobles con antígeno viral, tinciones con marcadores de viabilidad que podrían confirmar si el efecto observado es debido a que el virus mata a la célula y si el

efecto de la disminución de claudina -3 están relacionadas con la infección por ZIKV. Asimismo, las uniones estrechas no se compararon a diferentes niveles de confluencia, lo que resultaría importante para corroborar su ubicación en la membrana y funcionalidad.

CONCLUSIONES

- La proteína claudina -3 está presente en la línea celular endotelial cerebral humana HBEC-5i.
- La expresión de claudina -3 disminuyó en las HBEC-5i en presencia del ZIKV.
- La población de células HBEC-5i se dividió en dos subpoblaciones (SP1 y SP2 por la diferencia en la expresión de claudina -3.
- La SP1 presentó una disminución en la expresión de claudina -3 en presencia del ZIKV.
- A diferencia de la subpoblación SP1, la SP2, mostró aumento en la expresión de claudina -3 en presencia del ZIKV.
- Se sugiere un efecto de interacción/interplay entre la expresión de la claudina -3 y la exposición al ZIKV que depende de las multiplicidades de infección (0.1, 1.0 y 10 MOI) y los tiempos de inoculación (30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h).

PERSPECTIVAS

En nuestros resultados observamos una dispersión muy pequeña en los datos, lo que estadísticamente representa diferencias significativas en la expresión de claudina -3; sin embargo, es importante mencionar que estas diferencias podrían o no representar una diferencia desde el punto de vista fisiológico, lo que nos permite sugerir en futuros estudios el aumento del tamaño de la muestra para observar si el patrón de expresión de claudina -3 tiene un comportamiento similar al de nuestro trabajo y si su expresión puede correlacionarse con otros factores como la viabilidad celular, la infección viral, la permeabilidad y la TEER.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome. Neurological syndrome and congenital anomalies. World Health Organization. 2016.
2. Mlakar J, Korva, M., Tul, N., Popovic, M., Poljsak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;374:951-8.
3. Rubin EJ, Greene, M.F., Baden, L.R. Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;374:10.
4. Muñoz LS, Barreras, P., Pardo, C.A. Zika virus-associated neurological disease in the adult: Guillain-Barré syndrome, encephalitis, and myelitis. *Semin Reprod Med*. 2016;34::273-9.
5. Nascimento OJM, da Silva, I.R.F. . Guillain-Barre syndrome and Zika virus outbreaks. *Curr Opin Neurol*. 2017;30:1-8.
6. Moore CA, Staples, J.E., Dobyns, W.B., Pessoa, A., Ventura, C.V., da Fonseca, E.B., Marques, E.R., Ventura, L.O., Nogueira, N.N., Arena, F., Rasmussen, S.A. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr*. 2017;171(3):288-95.
7. Lindenbach BD, Rice, C.M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61.
8. Markoff L. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res*. 2003;59:177-228.
9. Ozkurt Z, Tanriverdi, E.C. . Global Alert: Zika Virus-an Emerging Arbovirus. *Eurasian J Med*. 2017;49:142-7.
10. Ong NH, Chua, C.L., Kent-Liew, J.W., Sulaiman, W.Y.W., Chan, Y.F., Sam, I.C., Vythilingam, I. Vector competence of Malaysian *Aedes aegypti* to Zika virus and impact of sequential arbovirus infections. *Acta Tropica*. 2020(105472).
11. Vorou R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;48:85-90.
12. Boyer S, Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., Failloux A.B. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*. 2018;20:646-60.
13. Blitvich BJ, Firth, A.E. Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization. *Viruses*. 2015;7:1927-59.
14. Chen T, He, X., Zhang, P., Yuan, Y., Lang, X., Yu, J., Qin, Z., Li, X., Zhang, Q., Zhu, L., Zhang, B., Wu, Q., Zhao, W. Research advancements in the neurological presentation of flaviviruses. *Rev Med Virol*. 2019;29.
15. Weaver SC, Barrett, A.D.T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:789-801.
16. Li Q, Kang, C. Structure and dynamics of Zika virus protease and its insights into inhibitor design. *Biomedicines*. 2021;19(9)(8):1044.
17. Musso D, Baud, D., Gubler, D.J. Zika virus: what do we know? *Clin Microbiol Infect*. 2016;6:494-6.
18. Musso D, Gubler, D.J. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):487-524.
19. Sironi M, Forni, D., Clerici, M., Cagliani, R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):e0004978.
20. Christian KM, Song, H., Ming, G. Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*. 2019;42(1):249-69.

21. Haddow AD, Schuh, A.J., Yasuda, C.Y., Kasper, M.R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R.B., Weaver, S.C. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6 (2):e1477.
22. Lanciotti RS, Kosoy, O.L., Laven, J.J. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1232-9.18.
23. Rossi SL, Ebel, G.D., Shan, C., Shi, P.Y., Vasilakis, N. Did Zika Virus Mutate to Cause Severe Outbreaks? *Trends in Microbiology.* 2018.
24. Anfasa F, Siegers, J. Y., van der Kroeg, M., Mumtaz, N., Stalin Raj, V., de Vrij, F. M. S., Widagdo, W., Gabriel, G., Salinas, S., Simonin, Y., Reusken, C., Kushner, S.A., Koopmans, M.P.G., Haagmans, B., Martina, B.E.E, van Riel, D. Phenotypic Differences between Asian and African Lineage Zika Viruses in Human Neural Progenitor Cells. *mSphere.* 2017;2(4).
25. Beaver JT, Lelutiu, N., Habib, R., Skountzou, I. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Frontiers in Immunology.* 2018.
26. Duggal NK, Ritter, J.M., McDonald, E.M., Romo, H., Guirakhoo, F., Davis, B.S., G.J.J, Chang, Brault, A.C. Differential Neurovirulence of African and Asian Genotype Zika Virus Isolates in Outbred Immunocompetent Mice. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(5):1410-7.
27. Simonin Y, Van Riel, D., Van De Perre, P., Rockx, B., Salinas, S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005821.
28. Nakayama E, Kato, F., Tajima, S., Ogawa, S., Yan, K., Takahashi, K., Sato, Y., Suzuki, T., Kawai, Y., Inagaki, T., Taniguchi, S., Le, T.T., Tang, B., Prow, N.A., Uda, A., Maeki, T., Lim, C., Khromykh, A.A., Suhrbier, A., Saijo, M Neuroinvasiveness of the MR766 strain of Zika virus in IFNAR mice maps to prM residues conserved amongst African genotype viruses. *PLOS Pathogens.* 2021;17(7):e1009788.
29. Shao Q, Herrlinger, S., Zhu, Y.N., Yang, M., Goodfellow, F., Stice, S.L., Qi, X.P., Brindley, M., Chen, J.F. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development.* 2017;144:4114-24.
30. Kaksonen M, Roux, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2018;19(5):313-26.
31. Agrellia A, Rodrigues de Mourab, R., Crovellaa, S., Cavalcanti-Brandão, L.A. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution.* 2019;69:22-9.
32. Mercer J, Schelhaas, M., Helenius, A. . Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:803-33.
33. Miller S, Krijnse-Locker, J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:363-74.
34. Sirohi D, Kuhn, R.J. . Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of Infectious Diseases.* 2017;216(10):S935-44.
35. DiNunno NM, Goetschius, D.J., Narayanan, A., Majowicz, S.A., Moustafa, I., Bator, C.M., Hafenstein, S.L., Jose, J. Identification of a pocket factor that is critical to Zika virus assembly. *Nat Commun.* 2020;11:4953.
36. Gubler DJ. History and emergence of Zika virus. *J Infect Dis.* 2017;216:S860-S7.
37. Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg, Camb.* 1979;83:213-9.
38. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954;48:139-45.
39. Cao-Lormeau VM, Blake, A., Mons, S., Lastere, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2016;387(10027):1531-9.

40. Duffy MR, Chen, T.H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536-43.
41. Araujo AQC, Silva, M.T.T., Araujo, A.P.Q.C. . Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain.* 2016:1-9
42. Araujo LM, Ferreira, M.L., Nascimento, O.J. Guillain-Barre syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2016;74:253-5.
43. Carod-Artal FJ. Epidemiology and neurological complications of infection by the Zika virus: a new emerging neurotropic virus. *Rev Neurol.* 2016;62:317-28.
44. Carod-Artal FJ. Neurological complications of Zika virus infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* 2018;16(5):399-410.
45. Costa LC, Valente, R., Fonseca, J., Rodrigues, M.S., Andrade, R., Paixão, E.S., Teixeira, M.G., Costa, M., Cardim, L., Carmo, E.H., Oliveira, W.K., Gonçalves, J., Fernandes, Q., Barreto, M.L., Queiroz, A., Gräf, T. New Insights on the Zika Virus Arrival in the Americas and Spatiotemporal Reconstruction of the Epidemic Dynamics in Brazil. *Viruses.* 2021;13:2-11.
46. Teixeira MG, Costa, M.C.N., de Oliveira, W.K., Nunes, M.L., Rodrigues, L.C. The Epidemic of Zika Virus-Related Microcephaly in Brazil: Detection, Control, Etiology, and Future Scenarios. *AJPH.* 2016;106(4):601-5.
47. Organization WH. Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. 2022.
48. Gutiérrez-Bugallo G, Piedra, L.A., Rodriguez, M., Bisset, J.A., Lourenço-de-Oliveira, R., Weaver, S.C., Vasilakis, N., Vega-Rúa, A. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nat Ecol Evol.* 2019;3:561-9.
49. Musso D, Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:359-61.
50. Moraes-Figueiredo LT. Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(Sec. Virus and Host).
51. Marris C, Olson, G., Saade, G., Hankins, G., Wen, T., Patel, J., and Weaver, S. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. *Am JPerinatol.* 2016.
52. Calvet GA, dos Santos, F.B., Sequeira, P.C. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29:459-66.
53. Cardoso CW, Paploski, I.A.D., Kikuti, M., et al. Outbreak of acute exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015.
54. De Chiara G, Marocchi, M.E., Sgarbanti, R., Civitelli, L., Ripoli, C., Piacentini, R., Garaci, E., Grassi, C., Palamara, A.T. Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2012;46:614-38.
55. Nelson BR, Roby, J.A., Dobyns, W.B., Rajagopal, L., Gale Jr, M., Adams Waldorf, K.M. Immune Evasion Strategies Used by Zika Virus to Infect the Fetal Eye and Brain. *Viral Immunology.* 2019;00:1-16.
56. Van den Pol AN, Mao, G., Yang, Y., Ornaghi, S., Davis, J. N. Zika Virus Targeting in the Developing Brain. *The Journal of Neuroscience.* 2017;37(8):2161-75.
57. Driggers RW, Ho, C.Y., Korhonen, E.M., Kuivanen, S., Ja" a " skela" inen, A.J., Smura, T., Rosenberg, A., Hill, D.A., DeBiasi, R.L., Vezina, G., et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med.* 2016.
58. Zanluca C, de Noronha, L., Duarte-dos Santos, C.N. Maternal-fetal transmission of the zika virus: an intriguing interplay. *Tissue Barriers.* 2017.

59. Villalobos-Sánchez E, Burciaga-Flores, M., Zapata-Cuellar, L., Camacho-Villegas, T.A., Elizondo-Quiroga, D.E. Possible Routes for Zika Virus Vertical Transmission in Human Placenta: A Comprehensive Review. *Viral Immunology*. 2022;35(6):392-403.
60. Barkovich AJ, Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., and Dobyns, W.B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*. 2012;135:1348-69.
61. Shao Q, Herrlinger, S., Yang, S. L., Lai, F., Moore, J. M., Brindley, M. A., *et al.* Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. *Development* 2016;143:4127-36.
62. Wen Z, Song, H., Ming, G-L. . How does Zika virus cause microcephaly? *GENES & DEVELOPMENT*. 2017;31:849-61.
63. Tang H, Hammack, C., Ogden, S.C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E.M., *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*. 2016;16:S1934-5909.
64. Nowakowski TJ, Pollen, A.A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., Kriegstein, A.R. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18:591-6.
65. Liu S, DeLalio, L.J., Isakson, B.E., Wang, T.T. . AXL-Mediated productive infection of human endothelial cells by Zika virus. *Circulation Research*. 2016;119(11):1183-9.
66. Meertens L, Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., *et al.* Axl Mediates ZIKA Virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Reports*. 2017;18:324-33.
67. Ferraris P, Cochet, M., Hamel, R., Gladwyn-Ng, I., Alfano, C., Diop, F., Garcia, D., Talignani, L., Montero-Menei, C.N., Nougairède, A., Yssel, H., Nguyen, L., Couplier, M., Missé, D. . Zika virus differentially infects human neural progenitor cells according to their state of differentiation and dysregulates neurogenesis through the Notch pathway. *Emerging Microbes & Infections*. 2019;8(1):1003-16.
68. Komarasamy TV, Adnan, N.A.A., James, W., Balasubramaniam, V.R.M.T. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Front Immunol*. 2022;13(773191).
69. Hughes BW, Addanki, K.C., Sriskanda, A.N., McLean, E., Bagasra, O. Infectivity of Immature Neurons to Zika Virus: A Link to Congenital Zika Syndrome. *EBioMedicine*. 2016;10:65-70.
70. Centers for Disease CaPUSDoHaHSC. Zika: Como proteger a las comunidades latinas de los Estados Unidos. 2016.
71. McGrogan A, Madle, G.C., Seaman, H.E., de Vries, C.S. The epidemiology of Guillain-Barré syndrome worldwide. A systematic literature review. *Neuro epidemiology*. 2009;32:150-63.
72. Oehler E, Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome - case report, French Polynesia. *Euro Surveill*. 2014;19.
73. van den Berg B, van den Beukel, J.C., Alsmá, J., *et al.* Guillain-Barre syndrome following infection with the Zika virus. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2016;160:D155.
74. Hughes RA, Cornblath, D.R. Guillain-Barre syndrome. *Lancet*. 2005;366:1653-66.
75. Ropper AH. The Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med*. 1992;326:1130-6.
76. Prieto CZ, Galván, M.L, Alva, P.G Neuropatía motora axonal aguda (síndrome de Guillain-Barré). *SEMERGEN*. 2007;33(9):488-91.
77. Prieto Zancudo C, Galván Luzuriaga M, Alva García P. Neuropatía motora axonal aguda (síndrome de Guillain-Barré). *Medicina de Familia SEMERGEN*. 2007;33(9):488-91.

78. Lebeau G, Frumence, E., Turpin, J., Begue, F., Hoarau, J.-J., Gadea, G., Krejbich-Trotot, P., Desprès, P., Viranaicken, W. Zika E Glycan Loop Region and Guillain-Barré Syndrome-Related Proteins: A Possible Molecular Mimicry to Be Taken in Account for Vaccine Development. *Vaccines*. 2021;9:283.
79. Sejvar JJ, Baughman, A.L., Wise, M., Morgan, O.W. Population incidence of Guillain-Barre's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*. 2011;36(2):123-33.
80. Leonhard SE, Bresani-Salvi, C.C., Lyra Batista, J.D., Cunha, S., Jacobs, B.C., Brito-Ferreira, M. L., P. Militão de Albuquerque, M. de F. Guillain-Barré syndrome related to Zika virus infection: A systematic review and meta-analysis of the clinical and electrophysiological phenotype. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2020;14(4):e0008264.
81. Mécharles S, Herrmann, C., Poullain, P., Tran, T.H., Deschamps, N., Mathon, G., et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet*. 2016;387:1481.
82. Neri VC, Xavier, M.F., Barros, P.O., Bento, C.M., Marignier, R., Alvarenga, R.P. Case Report: Acute Transverse Myelitis after Zika Virus Infection *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99(6):1419-21.
83. Pradhan F, Burns, J.D., Agameya, A., Patel, A., Alfaqih, M., Small, J.E., Ooi, W. Case Report: Zika Virus Meningoencephalitis and Myelitis and Associated Magnetic Resonance Imaging Findings. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(2):340-3.
84. Reinhold AK, Rittner, H.L. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. *Eur J Physiol* 2016.
85. Engelhardt B. The Blood-Central Nervous System Barriers Actively Control Immune Cell Entry into the Central Nervous System. *Current Pharmaceutical Design*. 2008;14:1555-65.
86. Abbott NJ, Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*. 2010;37:13-25.
87. Engelhardt B, Liebner, S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*. 2014;355:687-99.
88. Siegenthaler JA, Sohet, F., Daneman, R. 'Sealing off the CNS': cellular and molecular regulation of blood-brain barrier genesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23:1057-64.
89. McGavern DB, Kang, S.S. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature*. 2011;11:318-29.
90. Weidenfeller C, Svendsen, C. N., Shusta, E. V. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem*. 2007;101:555-65.
91. Daneman R, Zhou, L., Kebede, A. A., Barres, B. A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010 (b);468:562-6.
92. Serlin Y, Shelef, I., Knyazer, B., Friedman, A. . Anatomy and physiology of the Blood Brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;38:2-6.
93. Abbott NJ, Rönnbäck, L., Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:41-53.
94. Urban N, Guillemot, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:396.
95. Virgintino D, Girolamo, F., Errede, M., Capobianco, C., Robertson, D., Stallcup, W. B., et al. An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis. *Angiogenesis*. 2007;10:35-45.
96. Daneman R, Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Kaushal, A., Barres, B. A. The mouse blood-brain barrier transcriptome: A new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS ONE*. 2010 (a);5:e13741.
97. Liu WY, Wang, Z.B., Zhang, L.C., Wei, X., Li, L. Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2012;18:609-15.

98. Coisne C, Engelhardt, B. Tight Junctions in Brain Barriers During Central Nervous System Inflammation. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. 2011;15(5).
99. Obermeier B, Daneman, R., Ransohoff, R.M. . Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 2013;19:1584-96.
100. Zhao JZ, Nelson, A.R., Betsholtz, C., Zlokovic, B.V. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*. 2015;163:1064-78.
101. Berndt P, Winkler, L., Cording, J., Breitkreuz-Korf, O., Rex, A., Dithmer, S., Rausch, V., Blasig, R., Richter, M., Sporbert, A., Wolburg, H., Blasig, I.E., Haselof, R.F. Tight junction proteins at the blood-brain barrier: far more than claudin-5. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019.
102. Greene C, Hanley, N., Campbell, N. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS*. 2019;16(3).
103. Lochhead JJ, Yang, J., Ronaldson, P.T., Davis, T.P. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front Physiol*. 2020;11(914).
104. Liebner S, Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E.H., Kalbacher, H., Wolburg, H. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*. 2000;100:323-31.
105. Schrade A, Sade, H., Couraud, P.O., Romero, I.A., Weksler, B.B., Niewoehner, J. Expression and localization of claudins-3 and -12 in transformed human brain endothelium. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2012;9(6).
106. Wolburg H, Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E.H., Risau, W., Engelhardt, B. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*. 2003;105:586-92.
107. Laksitorini MD, Yathindranath, V., Xiong, W., Hombach-Klonisch, S., Miller, D.W. Modulation of Wnt/ β -catenin signaling promotes blood-brain barrier phenotype in cultured brain endothelial cells. *Scientific Reports*. 2019;9(19718).
108. Liebner S, Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., Taketo, M.M., von Melchner, H., Plate, K.H., Gerhardt, H., Dejana, E. Wnt/ β -catenin signaling controls development of the blood - brain barrier. *J Cell Biol*. 2008;183(3):409-17.
109. Steinemann A, Galm, I., Chip, S., Nitsch, C., Maly, I.P. Claudin-1, -2 and -3 Are Selectively Expressed in the Epithelia of the Choroid Plexus of the Mouse from Early Development and into Adulthood While Claudin-5 is Restricted to Endothelial Cells. *Front Neuroanat*. 2016;10(16).
110. Marshall EM, Koopmans, M.P.G., Rockx, B. A journey to the Central Nervous System: Routes of Flaviviral Neuroinvasion in human disease. *Viruses*. 2022;14:1-20.
111. Verma S, Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., Luo, H., Nakatsuka, A., Nerurkar, V.R. Nilo Occidental virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro Blood-Brain barrier. *Virology*. 2009;385:425-33.
112. Chiu C, Chu, L., Liao, I., Simanjuntak, Y., Lin, Y., Juan, C., Ping, Y. The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the Blood-Brain Barrier. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:1-15.
113. Mustafá YM, Meuren, L.M., Sharton Vinícius Antunes-Coelho, SH.V., Barros de Arruda, L. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Frontiers in microbiology*. 2019.

114. Morris G, Barichello, T., Stubbs, B., Köhler, C.A., Carvalho, A.F., Maes, M. Zika virus as an emerging neuropathogen: Mechanisms of neurovirulence and neuro-immune interactions. *Mol Neurobiol.* 2018;55:4160-84.
115. Velandia ML, Castellanos, J.E. Flavivirus Neurotropism, neuroinvasion, neurovirulence and neurosusceptibility: Clues to understanding flavivirus and dengue- induced encephalitis. *Viral Genomes-Molecular structure, diversity, gene expression mechanisms and host-virus interactions.* 2012;11:221-40.
116. Leda AR, Bertrand, L., Andras, I.E., El-Hage, N., Nair, M., Toborek, M Selective Disruption of the Blood-Brain Barrier by Zika Virus. *Frontiers in microbiology.* 2019;10(2158).
117. Papa M, Meuren, L.M., Coelho, S.V.A., de Oliveira Lucas, C.G., Mustafá, Y.M., Matassoli, F.L., Silveira, P.P., Frost, P.S., Pezzuto, P., Ribeiro, M.R., Tanuri, A., Nogueira, M.L., Campanati, L., Bozza, M.T., Neto, H.A.P., Pimentel-Coelho, P.M., et al. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Frontiers in microbiology.* 2017;8(2557).
118. Alimonti JB, Ribocco-Lutkiewicz, M., Sodja, C., Jezierski, A., Stanimirovic, D.B., Liu, Q., Haqqani, A.S., Conlan, W., Bani-Yaghoub, M. Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. *Fluids and Barriers of the CNS.* 2018;15(15).
119. Briant L DP, Choumet V, Misse D. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology.* 2014;464-465:26-32.
120. Greenwood J, Heasman, S.J., Álvarez, J.I., Prat, A., Lyck, R., Engelhardt, B. Leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37:24-39.
121. Klein RS, Garber, C., Funk, K.E., Salimi, H., Soung, A., Kanmogne, M., Manivasagam, S., Agner, S., Cain, M. Neuroinflammation during RNA viral infections. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:73-95.
122. Owens T, Renno, T., Taupin, V., Krakowski, M. Inflammatory cytokines in the brain: does the CNS shape immune responses? *Viewpoint.* 1994;15:566-71
123. De Vries HE, Blom-Roosemalen, M.C.M., van Oosten, M., de Boer, A.G., van Berkel, T.J.C., Breimer, D.D., Kuiper, J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *Journal of Neuroimmunology* 1996;64:37-43.
124. Morganti-Kossmann MC, Kossmann, T., Wahl, S.M Cytokines and neuropathology. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13:286-91.
125. Sommer C, White, F., et al. Cytokines, Chemokines, and Pain. *Pharmacology of Pain.* 2010:279-302.
126. Zhang JM, An, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45:27-37.
127. Mickael ME, Kubick, N., Klimovich, P., Flournoy, P.H., Bieńkowska, I., Sacharczuk, M. Paracellular and Transcellular Leukocytes Diapedesis Are Divergent but Interconnected Evolutionary Events. *Genes (Basel).* 2021;12(2):254.
128. Curfs JH, Meis, J.F., Hoogkamp-Korstanje, J.A A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:742-80.
129. Ziebell JM, Morganti-Kossmann, M.C. Involvement of Pro- and Anti- inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2010;7:22-30.
130. Strumillo ST, Kartavykh, D., de Carvalho Jr, F.F., Cruz, N.C., de Souza Teodoro, A.C., Diaz, R.S., Curcio, M.F. Host-virus interaction and viral evasion. *Cell Biol Int.* 2021;45:1124-47.
131. Colpitts CC, Baumert, T.F. Claudins in viral infection: from entry to spread. *Pflugers Arch.* 2017;469(1):27-34.

132. Scalzo AA, Corbett, A.J., Rawlinson, W.D., Scott, G.M., Degli-Esposti, M.A. The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection. *Immunology and Cell Biology*. 2007;85:46-54.
133. Lavie M, Dubuisson, J. Interplay between hepatitis C virus and lipid metabolism during virus entry and assembly. *Biochimie*. 2017;141:62-9.
134. Hatton OL, Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M., Martinez, O.M. The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res*. 2014;58:268-76.
135. Zhang S, Carriere, J., Lin, X., Xie, N., Feng, P. Interplay between Cellular Metabolism and Cytokine Responses during Viral Infection. *Viruses*. 2018;10(10):521.
136. Goodwin CM, Xu, S., Munger, J. Stealing the Keys to the Kitchen: Viral Manipulation of the Host Cell Metabolic Network. *Trends in Microbiology*. 2015;23(12):789-98.
137. Hou J, Baker, L. A., Zhou, L., Klein, R.S. Viral interactions with the blood-brain barrier: old dog, new tricks. *Tissue Barriers*. 2016;4(1):e1142492.
138. Spindler KR, Hsu, T. H. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends in Microbiology*. 2012;20(6):282-90.
139. Liu S, Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., Wang, T. . Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *Journal of Virology*. 2009;83(4):2011-14.
140. Mateo M, Generous, A., Sinn, P. L., and Cattaneo, R. Connections matter-how viruses use cell-cell adhesion components. *J Cell Sci*. 2015;128:431-9.
141. Quicke KM, Bowen, J. R., Johnson, E. L., McDonald, C. E., Ma, H., O'Neal, J. T., et al. Zika virus infects human placental macrophages. *Cell Host Microbe*. 2016;20:83-90.
142. Clé M, Desmetz, C., Barthelemy, J., Martin, M.F., Constant, O., Maarifi, G., Foulongne, V., Bolloré, K., Glasson, Y., De Bock, F., Blaquiere, M., Dehouck, L., Pirot, N., Tuailon, E., Nisole, S., Najioullah, F., Van de Perre, P., Cabié, A., Marchi, N., et al. Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. *Host-Microbe Biology*. 2020;11(4):e01183-20.
143. Lei C, Yang, Jian., Hu, Jia., Sun, X. . On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. *Virologica Sinica*. 2021;36 (1):141-4.
144. Che P TH, Li Q. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology*. 2013;446:303-13.
145. Medigeshi GR HA, Brien JD, Uhrlaub JL, Mason PW, Wiley C, Nikolich-Zugich J, Nelson JA. . Nilo Occidental virus capsid degradation of claudin proteins disrupts epithelial barrier function. *J Virol*. 2009 83:6125-34.
146. Castro Dias M CC, Lazarevic I, Baden P, Hata M, Iwamoto N, Francisco DMF, Vanlandewijck M, He L, Baier FA, Stroka D, Bruggmann R, Lyck R, Enzmann G, Deutsch U, Betsholtz C, Furuse M, Tsukita S, Engelhardt B. . Claudin-3-deficient C57BL/6J mice display intact brain barriers. *Sci Rep*. 2019;9(11):203.
147. Yang Z LP, Chen B, Zhang X, Xiao W, Wu S, Huang C, Feng D, Zhang W, Zhang J. . Autophagy alleviates hypoxia-induced blood-brain barrier injury via regulation of CLDN5 (claudin 5). *Autophagy*. 2021;17(10):3048-67.
148. Neuhaus W WM, Plattner VE, Germann B, Gabor F, Noe CR. . Expression of Claudin-1, Claudin-3 and Claudin-5 in human blood-brain barrier mimicking cell line ECV304 is inducible by glioma-conditioned media. *Neurosci Lett* 2008;446(2-3):59-64.
149. Greene C, Hanley, N., Campbell, N. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS*. 2019;16:3

150. Andrés IE PH, Tian J, Deli MA, Nath A, Hennig B, Toborek M. . Signaling mechanisms of HIV-1 Tat-induced alterations of claudin-5 expression in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(9):1159-70.
151. Huber JD WK, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(3):H1241-8.
152. Neuhaus W, Wirth, M., Plattner, V.E., Germann, B., Gabor, F., Noe, C.R. Expression of Claudin-1, Claudin-3 and Claudin-5 in human blood-brain barrier mimicking cell line ECV304 is inducible by glioma-conditioned media. *Neuroscience Letters.* 2008;446((2-3)):59-64.
153. Sladojevic N SS, Johnson AM, Choi J, Hu A, Dithmer S, Blasig IE, Keep RF, Andjelkovic AV. Claudin-1-Dependent Destabilization of the Blood-Brain Barrier in Chronic Stroke. *J Neurosci.* 2019;39(4):743-57.
154. Nava P LS, Arias CF, Islas S, González-Mariscal L. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117:5509-19.
155. Marchetti L EB. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. *Vasc Biol.* 2020 2(1):H1-H18.
156. Panganiban AT BR, Hattler JB, Bohannon DG, Bonaldo MC, Schouest B, Maness NJ, Kim WK. A Zika virus primary isolate induces neuroinflammation, compromises the blood-brain barrier and upregulates CXCL12 in adult macaques. *Brain Pathol.* 2020 30(6):1017-27.
157. Che P, Tang, H., Li, Q. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology.* 2013;446(1-2):303-13.
158. Brown CM, Bidle, K.D. Attenuation of virus production at high multiplicities of infection in *Aureococcus anophagefferens*. *Virology.* 2014;466-467:71-81.
159. Kazemi S, López-Muñoz, A.D., Holly, J., Jin, L., Yewdell, J.W., Dolan, B.P. . Variations in Cell Surface ACE2 Levels Alter Direct Binding of SARS-CoV-2 Spike Protein and Viral Infectivity: Implications for Measuring Spike Protein Interactions with Animal ACE2 Orthologs. *Journal of Virology.* 2022;96(17).
160. Haywood AM. Virus Receptors: Binding, Adhesion Strengthening, and Changes in Viral Structure. *Journal of Virology.* 1994;68(1):1-5.
161. Daniels BP KR. Viral sensing at the blood-brain barrier: new roles for innate immunity at the CNS vasculature. *Clin Pharmacol Ther.* 2015;97(4):372-9.
162. Tugizov S. Virus-associated disruption of mucosal epithelial tight junctions and its role in viral transmission and spread. *Tissue Barriers.* 2021;9(4):e1943274-1-18.

ANEXOS

ANEXO I Estandarización de anticuerpos con fibroblastos de prepucio (HFF).

Se obtuvieron cultivos primarios de fibroblastos de prepucio para la estandarización de los anticuerpos a utilizar en la técnica de inmunofluorescencia (**Fig.42**). Una vez confluentes alrededor del 80-90% y posterior a la exposición con ZIKV se obtuvieron las siguientes imágenes (**Fig. 43**) con base en las diluciones establecidas (1:150, 1:200 y 1:250) respectivamente; determinando que, el mejor marcaje de fluorescencia se obtuvo con la concentración 1:250 para el anticuerpo primario claudina -3 y 1:200 para anticuerpo secundario Alexa 488, debido a que se aprecia un buen marcaje celular, buena señal e intensidad de fluorescencia y menor cantidad de ruido en la imagen.

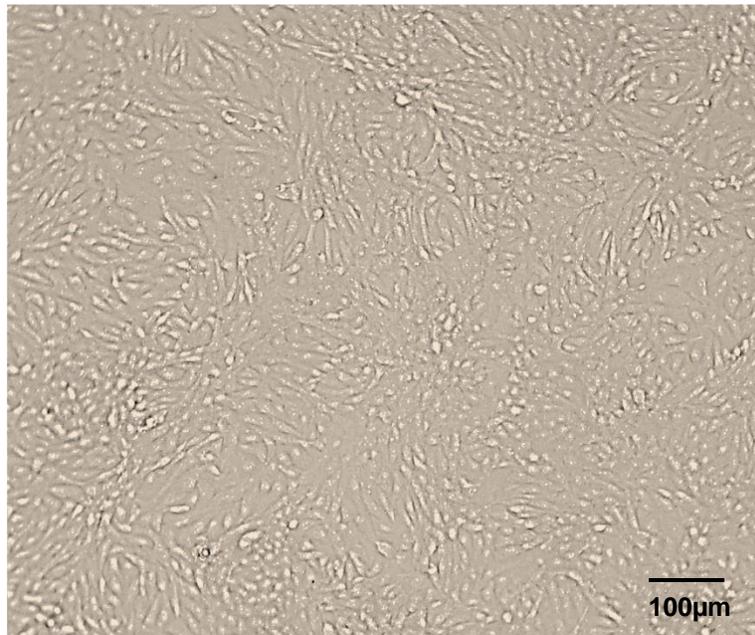


Figura 42. Cultivo celular de fibroblastos (HFF) aislados de prepucio. Confluencia alrededor del 90%.

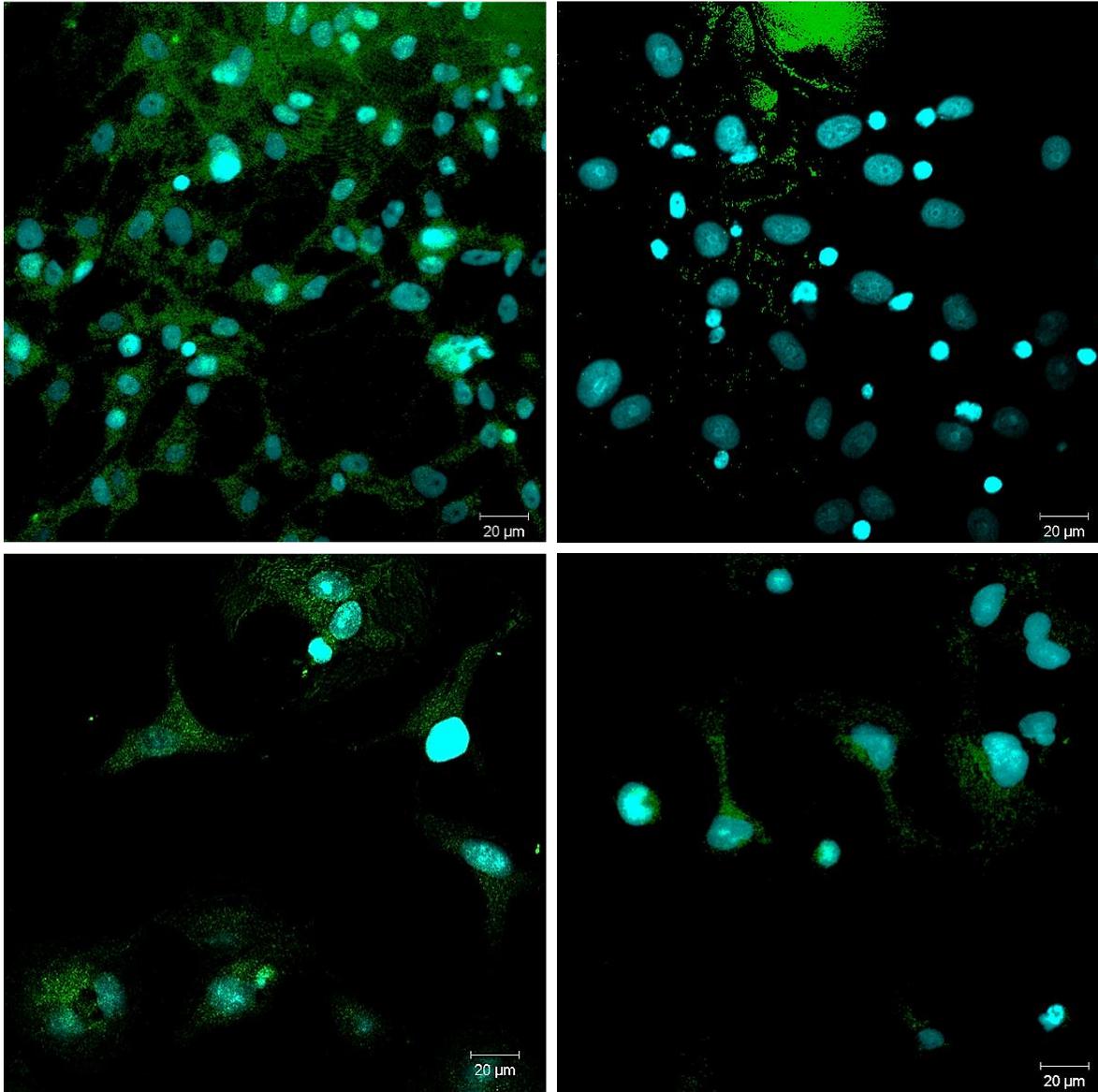


Figura 43. Diluciones del anticuerpo claudina -3 en fibroblastos de prepucio (HFF). **A.** Concentración 1:100. **B.** Concentración 1:150. **C.** Concentración 1:200. **D.** Concentración 1:250

ANEXO II Inmunofluorescencia indirecta en células HBEC-5i con 0.1 MOI

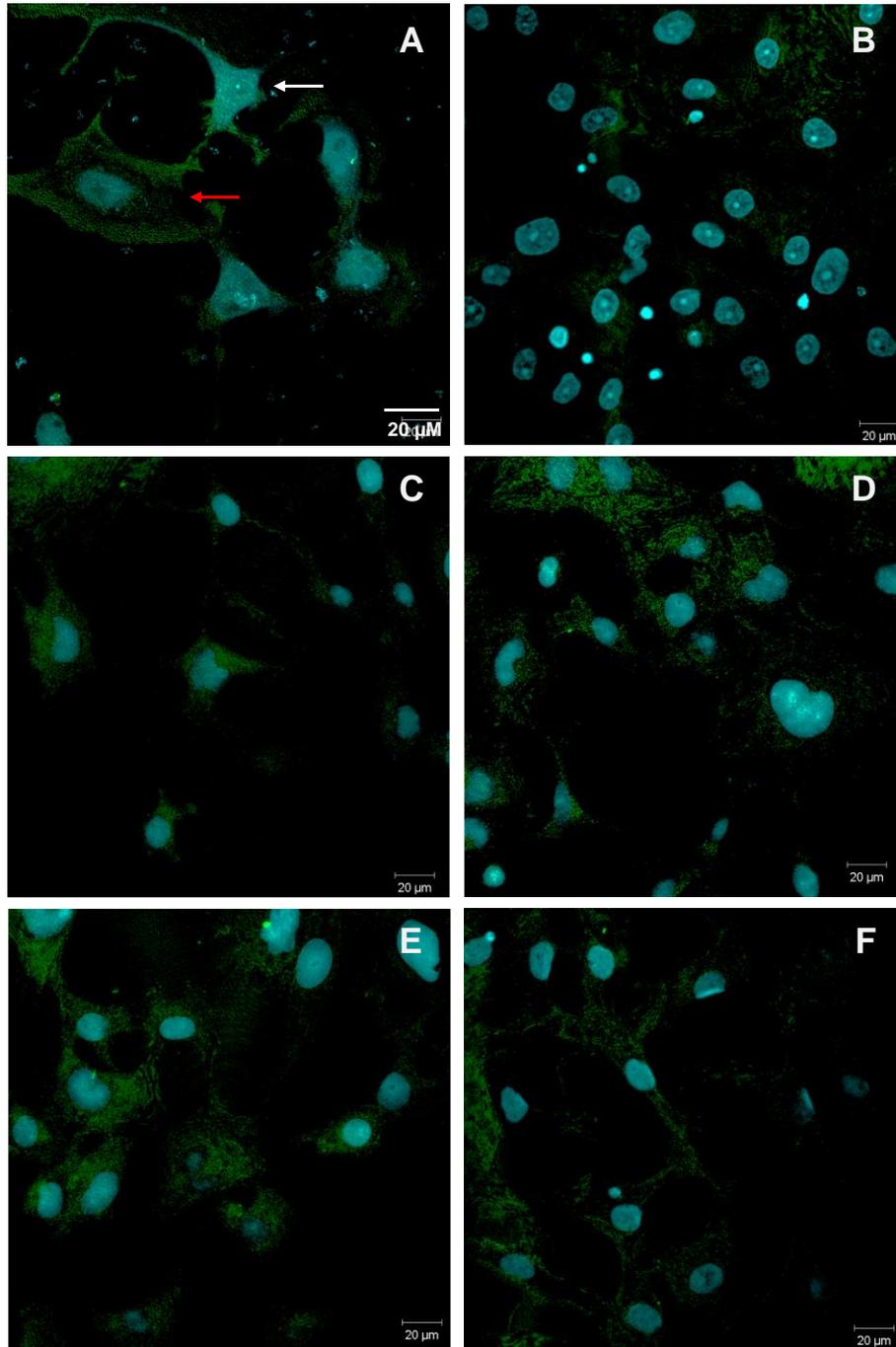


Figura 44. Expresión de la fluorescencia de la claudina -3 en células HBEC-5i infectadas con 0.1 MOI de ZIKV. **A.** Expresión a 30 min. **B.** Expresión a 1 h. **C.** Expresión a 3 h. **D.** Expresión a 6 h. **E.** Expresión a 12 h. **F.** Expresión a 24 h. Núcleos en azul teñidos con yoduro de propidio (flecha blanca) y claudina -3 en verde teñida con Alexa Flúor 488 (flecha roja).

ANEXO III Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por ZIKV en México 2015-2023

Entidad Federativa	Casos Confirmados 2015-2022	Casos Confirmados 2023	Total
Aguascalientes	1	0	1
Baja California	3	0	3
Baja California Sur	115	0	115
Campeche	94	0	94
Coahuila	336	0	336
Colima	297	0	297
Chiapas	823	0	823
Durango	5	0	5
Guanajuato	5	0	5
Guerrero	888	0	888
Hidalgo	285	0	285
Jalisco	682	0	682
México	49	0	49
Michoacán	70	0	70
Morelos	587	0	587
Nayarit	709	0	709
Nuevo León	950	0	950
Oaxaca	540	0	540
Puebla	225	0	225
Querétaro	17	0	17
Quintana Roo	391	0	391
San Luis Potosí	534	0	534
Sinaloa	340	0	340
Sonora	448	0	448
Tabasco	376	0	376
Tamaulipas	802	0	802
Veracruz	2,105	0	2,105
Yucatán	1,325	0	1,325
Zacatecas	1	0	1
Total	13,003	0	13,003

FUENTE: SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus del Zika.
* Hasta el 23 de enero de 2023

Casos confirmados de Síndrome de Guillain-Barré asociado a Zika en México.

Caso	Edad	Sexo	Entidad federativa de infección	Institución que realizó seguimiento y reporte	Diagnóstico	Estado del paciente
1	5	F	Chiapas	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
2	5	M	Tabasco	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
3	6	F	Tabasco	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
4	48	M	Guerrero	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
5	59	F	Chiapas	ISSTECH	PCR	Vivo
6	37	M	Chiapas	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo
7	26	M	Quintana Roo	Hospital Privado	PCR	Vivo
8	39	F	Guerrero	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
9	25	M	Michoacán	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
10	60	M	Guerrero	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
11	45	F	Veracruz	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo
12	75	M	Guerrero	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
13	39	F	Veracruz	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
14	16	M	Guerrero	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
15	37	M	Guerrero	Secretaría de Salud	PCR	Vivo
16	36	M	Sin precisión, notificado por Estado de México	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	PCR	Vivo
17	57	M	Yucatán	ISSSTECALI, Baja California	PCR	Vivo
18	50	M	Morelos	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo
19	9	M	Morelos	Instituto Mexicano del Seguro Social	PCR	Vivo

FUENTE: SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus del Zika. Actualizado al 6 de febrero de 2018.

Nota aclaratoria del proceso de confirmación:

El proceso de confirmación se realiza mediante la inclusión de las pacientes a un protocolo de estrecha vigilancia clínica y epidemiológica que consiste en estudio y seguimiento de la evolución de los casos, resultados por laboratorios pertenecientes a la Red Nacional y revisión del diagnóstico final por grupo multidisciplinario de expertos; es por ello que el estudio minucioso de estos pacientes llevó varias semanas hasta su plena confirmación.

Casos confirmados por asociación epidemiológica de Síndrome Congénito Asociado a Zika, México 2016 – 2021

Caso	Año	Probable Trimestre de Infección materna	Entidad Federativa	Institución	Unidad Que Realizó Seguimiento Y Reporte	Diagnóstico	Estado Del Paciente
1	2018	Segundo	Nayarit	IMSS-PROS	Hospital Rural # 22 "San Cayetano"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
2	2017	Indeterminado	Quintana Roo	SSA	Hospital General de Cancún Dr. Jesús Kumate Rodríguez	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
3	2017	Indeterminado	Chiapas	IMSS-PROS	Hospital Rural de Ocozacoautla	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
4	2017	Primero	Quintana Roo	IMSS-OR	Hospital General De Subzona MF 2 Cozumel	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
5	2017	Primero	Quintana Roo	SSA	Hospital Materno Infantil Morelos	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
6	2017	Primero	Veracruz	SSA	Hospital General Gral. Bernardo Peña	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo

7	2017	Primero	Oaxaca	SSA	Hospital General "Dr. Macedonio Benítez Fuentes"	Síndrome congénito asociado a Zika + Craneosinostosis	Vivo
8	2017	Primero	Oaxaca	SSA	Hospital General de Tuxtepec	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
9	2017	Indeterminado	Oaxaca	SSA	Hospital General "Dr. Macedonio Benítez Fuentes"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
10	2017	Primero	Yucatán	SSA	Hospital Materno Infantil	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
11	2017	Primero	Quintana Roo	SSA	Hospital Materno Infantil Morelos	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
12	2017	Primero	Oaxaca	SSA	Hospital de la Niñez Oaxaqueña	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
13	2017	Indeterminado	Veracruz	SSA	Hospital de Alta Especialidad de Veracruz	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
14	2017	Indeterminado	Veracruz	SSA			Vivo

15	2017	Indeterminado	Michoacán	IMSS-PROS	Hospital de la Comunidad Playa Vicente	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
16	2017		Veracruz	IMSS-PROS	Hospital Rural de Buena Vista	Síndrome congénito asociado a Zika + Craneosinostosis	Vivo
17	2017	Primero	Nuevo León	IMSS-OR	Hospital Rural Chicontepec	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
18	2017	Primero	Quintana Roo	PRIVADO	Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) No.23 "Dr. Ignacio Morones Prieto"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
19	2017	Primero	Campeche	SSA	Hospital Galenia	Síndrome congénito asociado a Zika	Muerto
20	2017	Tercero	Veracruz	IMSS-OR	Hospital General de Escárcega Dr. Janell Romero Aguilar	Síndrome congénito asociado a Zika + Holoprosencefalia	Muerto
					Hospital General de Zona No. 08	Síndrome congénito asociado a Zika	Muerto

28	2017	Indeterminado	Sinaloa	SSA	Hospital General los Mochis	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
29	2017	Segundo	Yucatán	IMSS-OR	Hospital General Regional No. 1 "Lic. Ignacio García Téllez"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
30	2017	Primero	Sinaloa	SSA	Hospital de la Mujer	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
31	2017	Primero	Tamaulipas	IMSS-OR	Hospital General de Zona No. 15 Reynosa	Síndrome congénito asociado a Zika + Hidrocefalia	Vivo
32	2017	Primero	Sinaloa	PRIVADO	Hospital Civil de Culiacán	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
33	2018	Indeterminado	San Luis Potosí	IMSS-PROS	Hospital Rural No.41 "Cerritos"	Síndrome congénito asociado a Zika	Muerto
34	2018	Segundo	Nuevo León	IMSS-OR	Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAЕ) No.23 "Dr. Ignacio Morones Prieto"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo

35	2018	Primero	Nayarit	SSA	Hospital Civil "Dr. Antonio González Cuevara"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
36	2018	Primero	Nayarit	SSA	Hospital Civil "Dr. Antonio González Cuevara"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
37	2018	Primero	Sinaloa	SSA	Hospital de la Mujer	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
38	2019	Primero	Nayarit	IMSS-OR	Hospital General de Zona No. 1 "Dr. Luis Ernesto Miramontes Cárdenas"	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
39	2018	Segundo	Morelos	SSA	Hospital del niño y adolescente	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
40	2018	Primero	Morelos	SSA	SINDIS (Servicios Integrales para la Prevención y Atención de la Discapacidad)	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
41	2021	Tercero	Morelos	SSA	Hospital General De Jojutla	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
42	2021	Tercero	Morelos	SSA	SINDIS (Servicios Integrales para la Prevención y Atención de la Discapacidad)	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo

43	2021	Segundo	Morelos	SSA	SINDIS (Servicios Integrales para la Prevención y Atención de la Discapacidad)	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo
44	2021	Primero	Morelos	SSA	Hospital General De Jojutla	Síndrome congénito asociado a Zika	Vivo

Fuente: Dirección General de Epidemiología. Fecha de actualización 13 abril de 2022.

Nota aclaratoria del proceso de confirmación:

Los casos confirmados por asociación epidemiológica son dictaminados a través de un análisis realizado por un Comité de Expertos, en donde parte de sus integrantes son miembros del Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CONAVE), así como especialistas en genética del Hospital General de México, Centro Médico Nacional Siglo XXI, el INPer, el Centro de Equidad de Género y Salud Reproductiva (CNEGSR). La integración de los expedientes de cada uno de los casos es llevada a cabo por los epidemiólogos que forman parte del Sistema Nacional para la Vigilancia Epidemiológica (SINAVE); en el expediente se incluye información clínica, epidemiológica, estudios de laboratorio incluyendo el diagnóstico molecular. Para la determinación de estos casos se tomó en cuenta la presencia de uno o más criterios clínicos de Síndrome Congénito Asociado a Zika y antecedente de epidemiológico de exposición a virus Zika en la madre durante el embarazo (residencia o tránsito en zona geográfica donde se ha comprobado circulación de virus Zika, presencia de sintomatología o prueba positiva a infección por virus Zika).

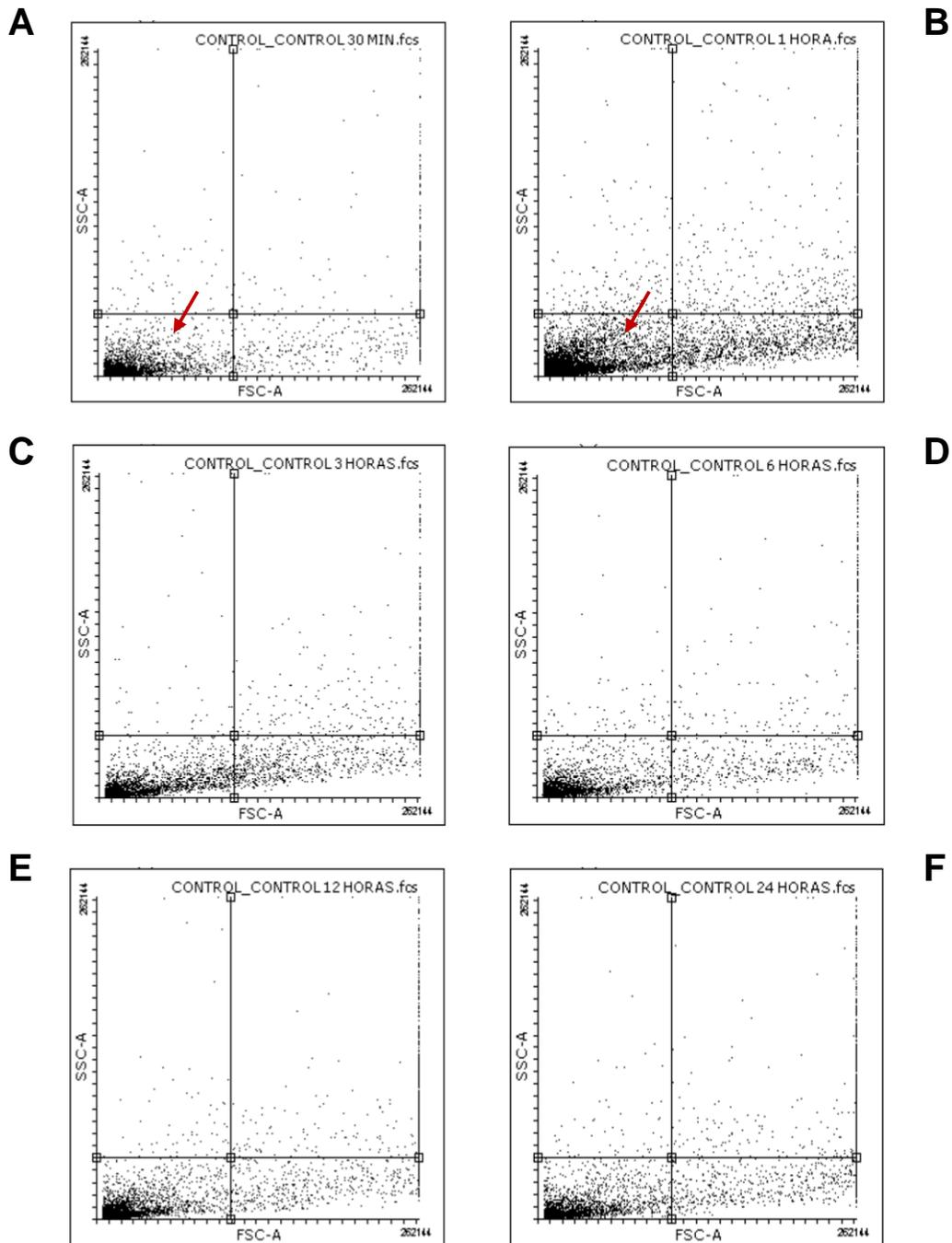
ANEXO IV. Dotplots representativos del tamaño y la granularidad de la población de células HBEC-5i.

Figura 45. Dotplots que representan el tamaño y la granularidad de la población de células endoteliales HBEC-5i por citometría de flujo en los grupos control a los diferentes tiempos **A.** Dotplot 30 min. **B.** Dotplot 1 h. **C.** Dotplot 3 h. **D.** Dotplot 6 h. **E.** Dotplot 12 h. **F.** Dotplot 24 h. Se destaca con flechas rojas la población tomada para las mediciones. $n=3$.

ANEXO V Dotplots de la fluorescencia basal de las células HBEC-5i

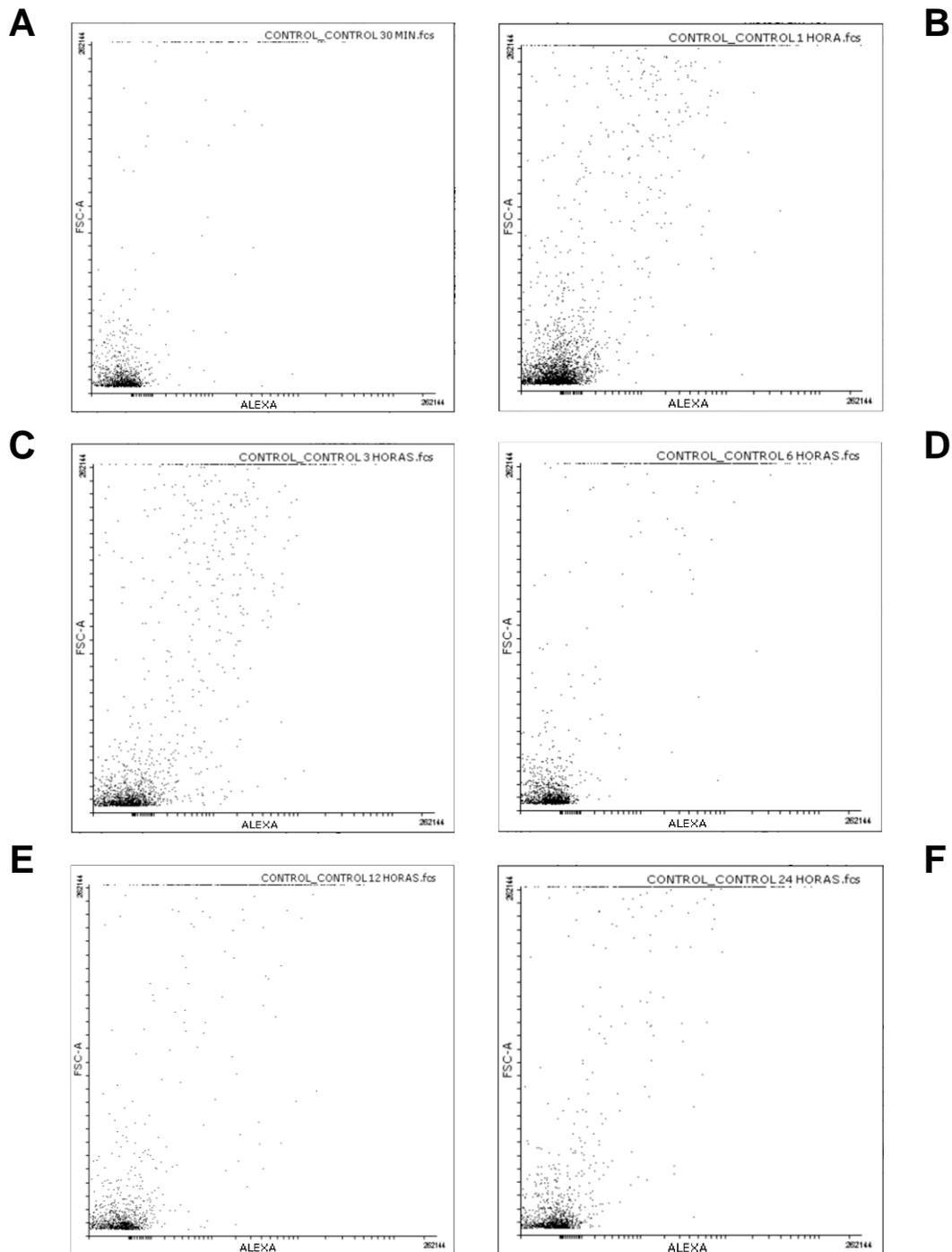


Figura 46. Expresión de la fluorescencia basal de las células HBEC-5i por citometría de flujo en los grupos control sin el marcador Alexa 488. **A.** Tiempo 30 min. **B.** Tiempo 1 h. **C.** Tiempo 3 h. **D.** Tiempo 6 h. **E.** Tiempo 12 h. **F.** Tiempo 24 h. $n=3$.

ANEXO VI. Dotplots e histogramas de las subpoblaciones de células HBEC-5i por fluorescencia

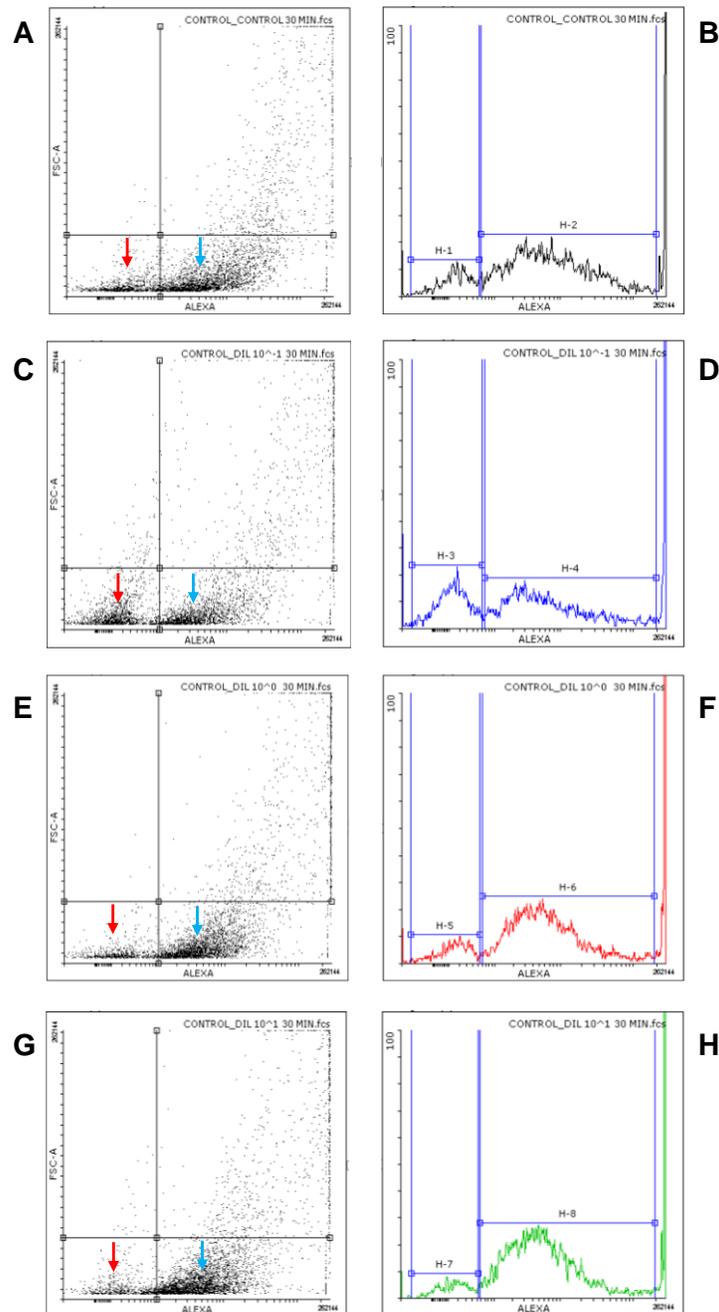


Figura 47. Expresión de la fluorescencia de la claudina -3 a los 30 min p.i. en la población de células HBEC-5i por citometría de flujo. Se muestran los dotplots (izquierda) e histogramas (derecha) con las dos subpoblaciones (marcadas con flechas rojas) por su emisión de fluorescencia **A.** Dotplot grupo control. **B.** Histograma grupo control. **C.** Dotplot 0.1 MOI. **D.** Histograma 0.1 MOI. **E.** Dotplot 1.0 MOI. **F.** Histograma 1.0 MOI. **G.** Dotplot 10 MOI. **H.** Histograma 10 MOI. n=3.

Dotplots e histogramas de las subpoblaciones de células HBEC-5i por fluorescencia

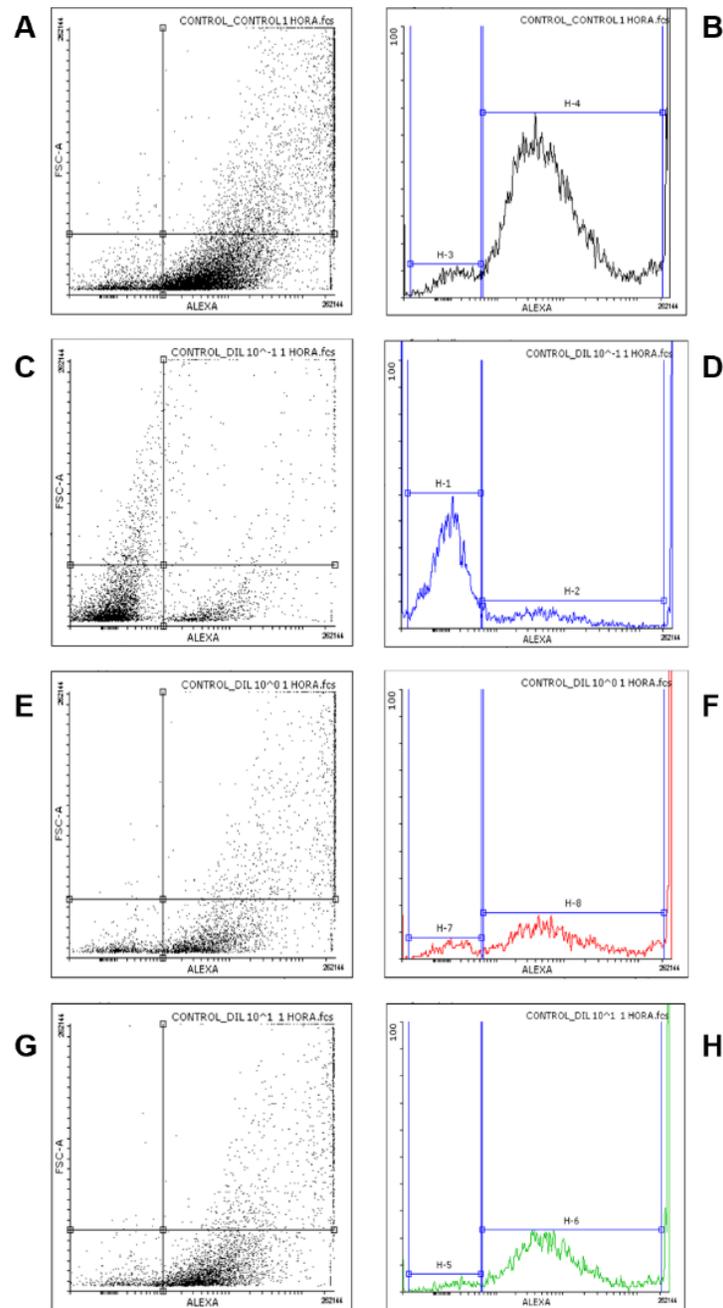


Figura 48. Expresión de la fluorescencia de la claudina -3 a 1 h p.i. en la población de células HBEC-5i por citometría de flujo. Se muestran los dotplots (izquierda) e histogramas (derecha) con las dos subpoblaciones diferenciadas por su emisión de fluorescencia **A.** Dotplot grupo control. **B.** Histograma grupo control. **C.** Dotplot 0.1 MOI. **D.** Histograma 0.1 MOI. **E.** Dotplot 1.0 MOI. **F.** Histograma 1.0 MOI. **G.** Dotplot 10 MOI. **H.** Histograma 10 MOI. n=3.

Dotplots e histogramas de las subpoblaciones de células HBEC-5i por fluorescencia

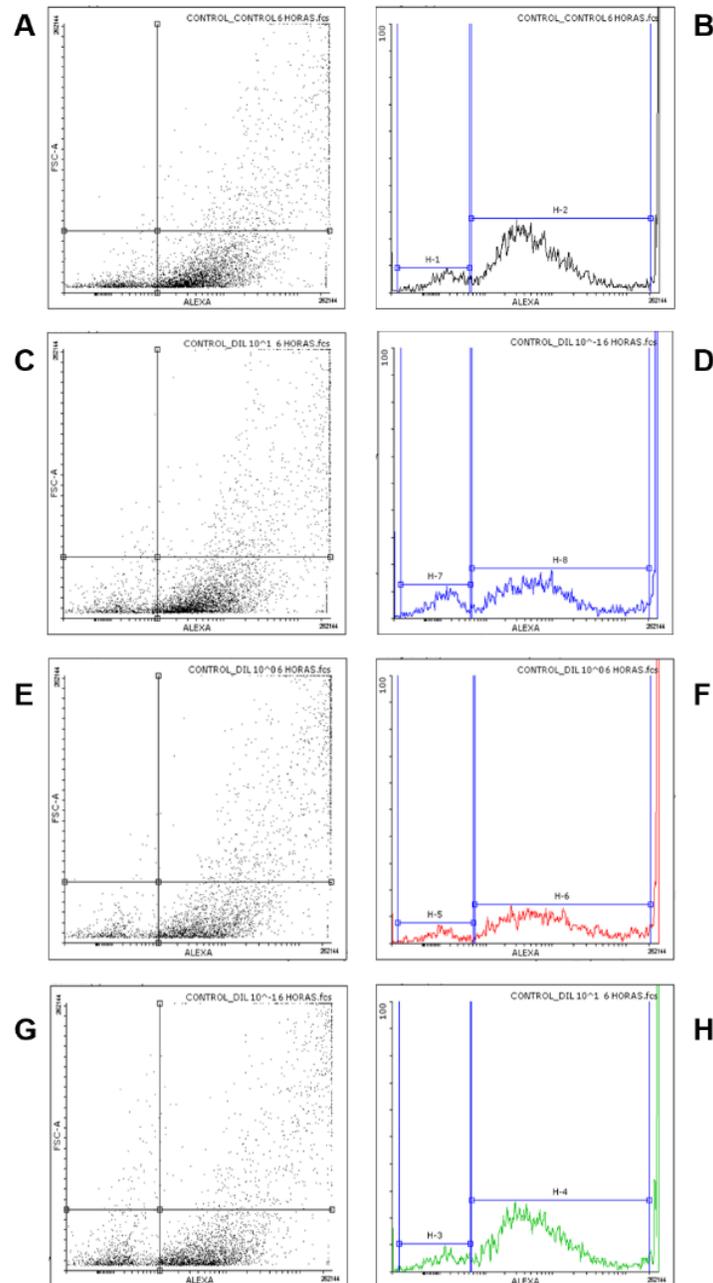


Figura 49. Expresión de la fluorescencia de la claudina -3 a 6 h p.i. en la población de células HBEC-5i por citometría de flujo. Se muestran los dotplots (izquierda) e histogramas (derecha) con las dos subpoblaciones diferenciadas por su emisión de fluorescencia **A.** Dotplot grupo control. **B.** Histograma grupo control. **C.** Dotplot 0.1 MOI. **D.** Histograma 0.1 MOI. **E.** Dotplot 1.0 MOI. **F.** Histograma 1.0 MOI. **G.** Dotplot 10 MOI. **H.** Histograma 10 MOI. $n=3$.

Dotplots e histogramas de las subpoblaciones de células HBEC-5i por fluorescencia

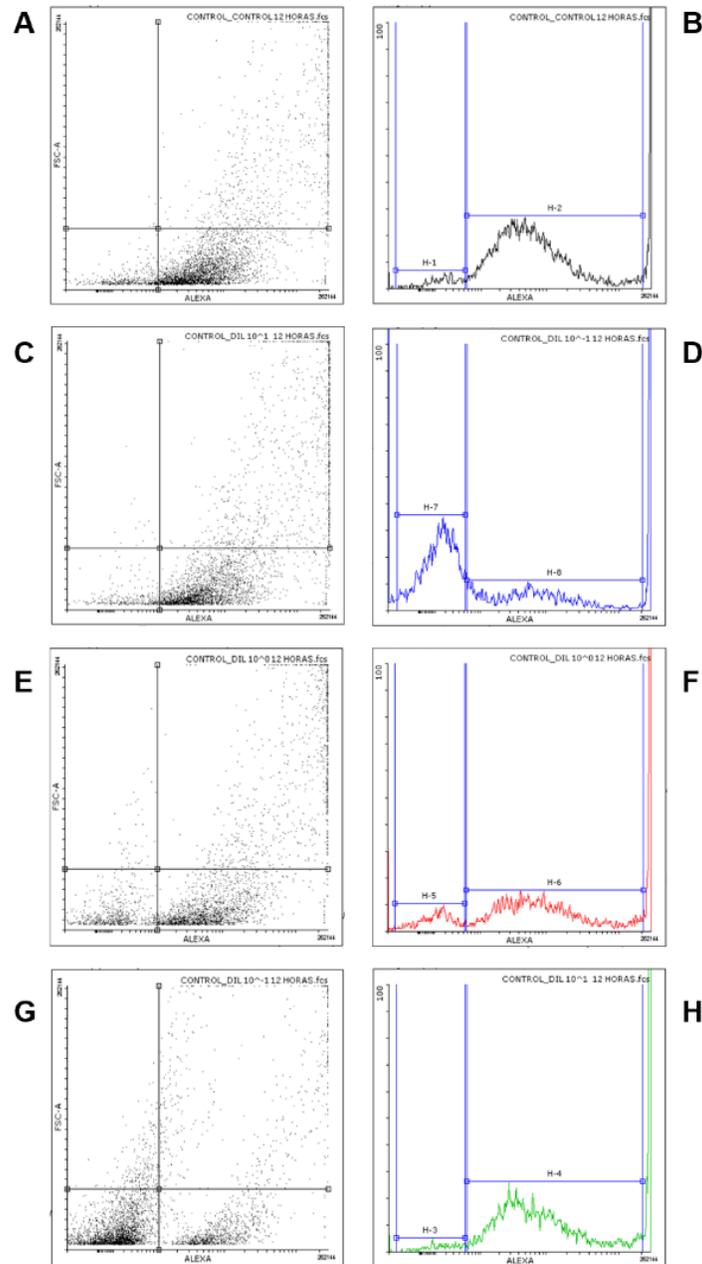


Figura 50. Expresión de la fluorescencia de la claudina -3 a 12 h p.i. en la población de células HBEC-5i por citometría de flujo. Se muestran los dotplots (izquierda) e histogramas (derecha) con las dos subpoblaciones diferenciadas por su emisión de fluorescencia **A.** Dotplot grupo control. **B.** Histograma grupo control. **C.** Dotplot 0.1 MOI. **D.** Histograma 0.1 MOI. **E.** Dotplot 1.0 MOI. **F.** Histograma 1.0 MOI. **G.** Dotplot 10 MOI. **H.** Histograma 10 MOI. n=3.

Dotplots e histogramas de las subpoblaciones de células HBEC-5i por fluorescencia

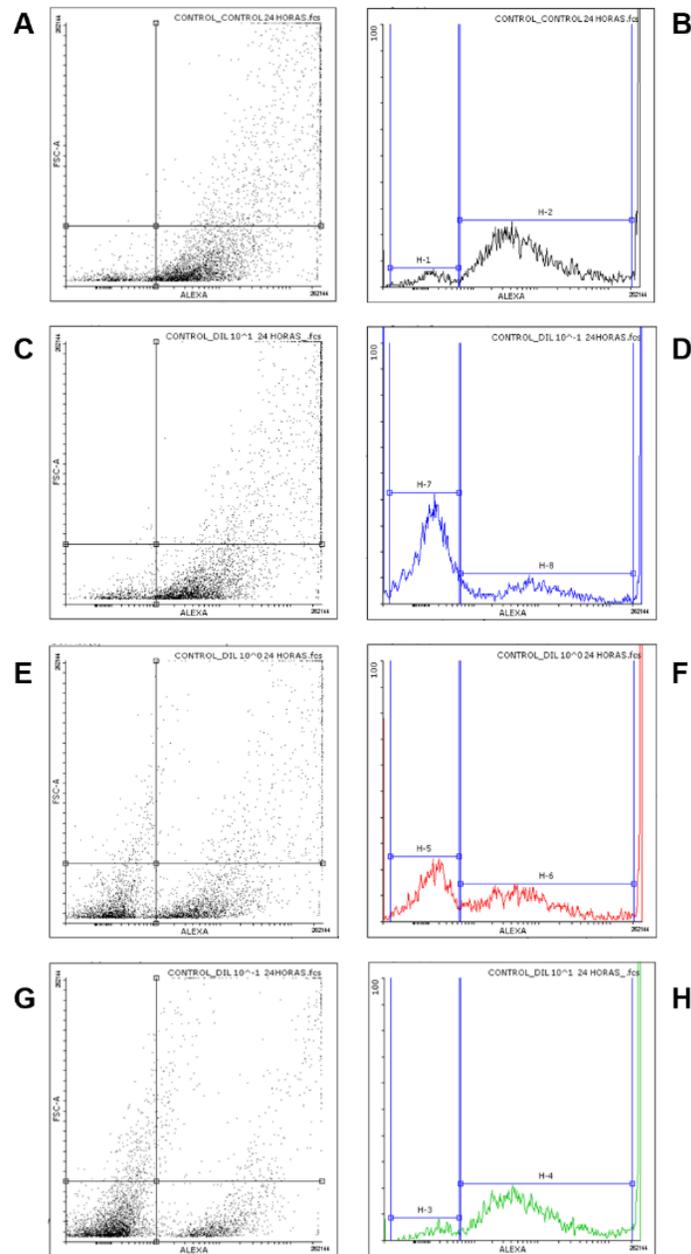


Figura 51. Expresión de la fluorescencia de la claudina -3 a 24 h p.i. en la población de células HBEC-5i por citometría de flujo. Se muestran los dotplots (izquierda) e histogramas (derecha) con las dos subpoblaciones diferenciadas por su emisión de fluorescencia **A.** Dotplot grupo control. **B.** Histograma grupo control. **C.** Dotplot 0.1 MOI. **D.** Histograma 0.1 MOI. **E.** Dotplot 1.0 MOI. **F.** Histograma 1.0 MOI. **G.** Dotplot 10 MOI. **H.** Histograma 10 MOI. $n=3$.