



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“Caracterización del fenotipo evasor de interferones tipo I de aislados
de *Flavivirus* circundantes en el estado de Yucatán”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

ERICK ALBERTO DEL ANGEL ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Bustos Arriaga

Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2021.





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.

Con todo mi cariño

***Para mi familia, mis padres Heliodoro y Juanita,
mis hermanos y Fer, por haberme apoyado siempre.***

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. José Bustos Arriaga y a QFB. Tannya Karen Castro Jiménez, por despertar en mí el interés por la ciencia y apoyarme tanto en el laboratorio como personalmente.

A quienes forman parte del Laboratorio 17 y se volvieron mis amigos, especialmente María, Leonardo, Marcos, Vale y Jazmín. Gracias por estar siempre presentes y les deseo éxito en sus planes futuros.

El siguiente proyecto fue realizado gracias al apoyo financiero de PAPIIT, DGAPA, UNAM.

Proyectos: IA209017 e IA204119 y del Programa de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, CONACyT con el Proyecto PN2029



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Caracterización del fenotipo evasor de interferones tipo I de aislados de Flavivirus Circundantes en el estado de Yucatán.

Que presenta el pasante: Erick Alberto Del Angel Romero
Con número de cuenta: 312153809 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	<i>Ana Laura Vázquez Martínez</i>
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	

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

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Caracterización del fenotipo evasor de interferones tipo I de aislados de Flavivirus Circundantes en el estado de Yucatán.

Que presenta el pasante: Erick Alberto Del Angel Romero
Con número de cuenta: 312153809 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	

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

LMCF/cea*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Caracterización del fenotipo evasor de interferones tipo I de aislados de Flavivirus Circundantes en el estado de Yucatán.

Que presenta el pasante: Erick Alberto Del Angel Romero
Con número de cuenta: 312153809 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	_____
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	_____
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	_____

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

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Caracterización del fenotipo evasor de interferones tipo I de aislados de Flavivirus Circundantes en el estado de Yucatán.

Que presenta el pasante: **Erick Alberto Del Angel Romero**
Con número de cuenta: 312153809 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	_____
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	<i>Erik González Ballesteros</i>
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	_____

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

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Caracterización del fenotipo evasor de interferones tipo I de aislados de Flavivirus Circundantes en el estado de Yucatán.

Que presenta el pasante: Erick Alberto Del Angel Romero
Con número de cuenta: 312153809 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	

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

LMCF/cga*

Índice

Índice de figuras	10
Índice de tablas	11
Abreviaturas	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Generalidades de los <i>Flavivirus</i>	16
2.1.1. Epidemiología en México.	16
2.1.2. Importancia del vector	17
2.2. Virus dengue	18
2.2.1. Clasificación de la enfermedad del dengue	18
2.3. Virus Zika.	19
2.3.1. Manifestaciones clínicas de la enfermedad	19
2.3.2. Vías de infección del virus Zika.....	20
2.4. El virión flaviviral.	20
2.4.1. Genoma de <i>Flavivirus</i>	21
2.4.2. Proteínas estructurales.	21
2.4.3. Proteínas no estructurales (NS).	22
2.5. Ciclo replicativo	22
2.6. Sistema inmunológico innato antiviral.....	24
2.6.1. Receptores tipo toll (TLR).....	25
2.6.2. Helicasas tipo RIG-I (RLRs).....	25
2.7. Respuesta antiviral por interferones.....	26
2.7.1. Evasión del sistema inmunológico innato por los <i>Flavivirus</i>	27
3. Antecedentes directos	29
4. JUSTIFICACIÓN.....	30
5. HIPÓTESIS	30
6. OBJETIVO GENERAL.....	30
6.1. Objetivos particulares	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1. Muestras.....	31
7.2. Virus.....	31

7.3. Líneas celulares.....	31
7.4. Amplificación y purificación de preparaciones virales de aislados de <i>Flavivirus</i>	32
7.5. Titulación de Unidades Formadoras de Placa por inmunocitoquímica.....	32
7.6. Tipificación molecular.....	33
7.7. Inmunofluorescencia.....	34
8. RESULTADOS.....	36
9. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	44
10. CONCLUSIONES.....	47
11. PERSPECTIVAS.....	47
12. REFERENCIAS.....	48
ANEXOS.....	54

Índice de figuras

FIGURA 1. INCIDENCIA Y SEROTIPOS AISLADOS DE DENGUE POR ENTIDAD FEDERATIVA DURANTE 2020.....	17
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>Aedes. Aegypti</i> Y <i>Aedes Albopictus</i>	18
FIGURA 3 . CURSO CLÍNICO DEL DENGUE	19
FIGURA 4 . ESTRUCTURA CRIOMICROSCOPIA DEL VIRUS ZIKA	20
FIGURA 5. ESQUEMA DEL GENOMA DE LOS <i>FLAVIVIRUS</i>	21
FIGURA 6. ESQUEMATIZACIÓN DEL COMPLEJO REPLICATIVO	23
FIGURA 7. CICLO REPLICATIVO DE LOS <i>FLAVIVIRUS</i>	24
FIGURA 8. ESQUEMATIZACIÓN DE LA VÍA DE ACTIVACIÓN DE TLRS	25
FIGURA 9. ESQUEMATIZACIÓN DE LA VÍA DE ACTIVACIÓN DE RIG-I.....	26
FIGURA 10. EFECTO ANTIVIRAL DE ISGS	27
FIGURA 11. MICROSCOPIA ÓPTICA DE AMPLIFICACIÓN VIRAL EN CULTIVO CELULAR VERO DURANTE 3DPI.....	36
FIGURA 12. ELECTROFORESIS DE LA TIPIFICACIÓN POR RT-PCR	37
FIGURA 13. INMUNOFLUORESCENCIA DE ANTÍGENO VIRAL EN CULTIVO CELULAR VERO	38
FIGURA 14. INMUNOFLUORESCENCIA DE ANTÍGENO VIRAL EN CULTIVO CELULAR HFF.....	39
FIGURA 15. CUANTIFICACIÓN DE PFUs POR INMUNOCITOQUÍMICA DE <i>FLAVIVIRUS</i>	40
FIGURA 16. CINÉTICA DE INFECCIÓN EN CÉLULAS VERO Y EN CÉLULAS HFF INFECTADAS CON DENV1 WP.....	41
FIGURA 17. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE LA INFECCIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>FLAVIVIRUS</i> ...	43

Índice de tablas

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS	31
TABLA 2. CONDICIONES PARA PCR DE DENV Y ZIKV	34
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.....	34

Abreviaturas.

C:	Proteína de cápside (del inglés <i>capsid protein</i>)
CARD:	Dominios de reclutamiento de activación de caspasas (del inglés <i>caspase-activation recruitment domains</i>)
CD14:	Grupo de diferenciación 14 (del inglés <i>cluster differentiation14</i>)
cDNA:	DNA complementario (del inglés <i>complementary DNA</i>)
CHIKV:	Virus Chikungunya (del inglés <i>chikungunya virus</i>)
CPE:	Efecto citopático (del inglés <i>cytopathic effect</i>)
DCSA:	Dengue con signos de alarma
DC-SIGN:	Molécula de adhesión intracelular específica 3 no integrina de célula dendrítica (del inglés <i>Dendritic Cell- Specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non integrin</i>)
DENV	Virus dengue (del inglés <i>dengue virus</i>)
DG:	Dengue grave
DMEM:	Medio MEM modificado por Dulbeco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNG:	Dengue no grave
dsRNA	RNA bicatenario (del inglés <i>doubly-stranded RNA</i>)
dpi:	Días post-infección
E:	Proteína de envoltura (del inglés <i>envelope protein</i>)
ER:	Retículo endoplásmico (del inglés <i>endoplasmic reticulum</i>)
GRP78/BiP:	Proteína de unión a inmunoglobulina (del inglés <i>binding immunoglobulin protein</i>)
IFIT:	Proteína con repeticiones en tetratricopeptidos inducidos por interferón (del inglés <i>interferon induced protein with tetratricopeptide repeats</i>)
IFN:	Interferón (del inglés <i>interferon</i>)
IFNAR:	Receptor de interferón alfa (del inglés <i>interferon alpha receptor</i>)
IgG:	Inmunoglobulina G (del inglés <i>immunoglobulin G</i>)
IgM:	Inmunoglobulina M (del inglés <i>immunoglobulin M</i>)
IKK:	La cinasa I κ B (del inglés <i>the IκB kinase</i>)
IL-1:	Interleucina 1 (del inglés <i>interleukin-1</i>)
IRAK:	Cinasas asociadas al receptor de interleucina 1 (del inglés <i>interleukin-1 receptor-associated kinases</i>)
IRF:	Factor de regulación de interferón (del inglés <i>interferon regulatory factor</i>)
ISG:	Genes estimulados por interferón (del inglés <i>interferon-stimulated genes</i>)
ISGF3:	Factor 3 de ISG (del inglés <i>ISG factor 3</i>)
JAK:	Cinasa activada por Janus (del inglés <i>Janus-activated kinase</i>)
JEV:	Virus de la encefalitis Japonesa (del inglés <i>Japanese encephalitis virus</i>)
MAVS:	Proteína adaptadora de señalización antiviral mitocondrial (del inglés <i>mitochondrial antiviral signaling adaptor protein</i>)
MDA5	Proteína 5 asociada a diferenciación de melanoma (del inglés <i>melanoma differentiation-Associated protein 5</i>)
MyD88:	Respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (del inglés <i>myeloid differentiation primary response 88</i>)
MOI:	Multiplicidad de infección (del inglés <i>multiplicity of infection</i>)
NC:	Nucleocápside (del inglés <i>nucleocapsid</i>)
NF- κB:	Factor nuclear Kappa B (del inglés <i>Nuclear factor kappa B</i>)
NS:	Proteínas no estructurales (del inglés <i>non structural protein</i>)
OAS:	2'5'-oligoadenilato sintetasa (del inglés <i>2'5'-oligoadenylate synthetase</i>)

ORF:	Marco de lectura abierto (del inglés <i>open reading frame</i>)
PAMPs:	Patrones moleculares asociados con patógenos (del inglés <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PFUs:	Unidades formadoras de placa (del inglés <i>plaque-forming unit</i>)
PKR:	Proteína cinasa dependiente de RNA (del inglés <i>RNA-dependent protein kinases</i>)
prM:	Proteína precursora de membrana (del inglés <i>the precursor to M</i>)
PRR:	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés <i>patron recognition receptors</i>)
sfRNA:	RNA de flavivirus subgenómico (del inglés <i>subgenomic flavivirus RNA</i>)
RBP:	Proteínas de unión a RNA (del inglés <i>RNA binding proteins</i>)
RdRp:	RNA polimerasa dependiente de RNA (del inglés <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RIG-I:	Gen I inducido por ácido retinoico (del inglés <i>Retinoic acid-inducible gene I</i>)
RLH:	Helicasas tipo RIG-1 (del inglés <i>RIG-I-like receptors</i>)
RPMI:	Medio Roswell Park Memorial Institute (del inglés <i>Roswell park memorial institute medium</i>)
SCX:	Serocomplejo (del inglés <i>serocomplex</i>)
SFB:	Suero fetal bovino
ssRNA:	RNA monocatenario (del inglés <i>single stranded RNA</i>)
STAT:	Transductor de señal y activador de transcripción (del inglés <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TBK1:	Cinasa de unión TANK 1 (del inglés <i>TANK binding Kinase 1</i>)
TGN:	Red trans-Golgi (del inglés <i>Trans-Golgi network</i>)
TIR:	Dominio Toll/ receptor de interleucina 1 (del inglés <i>Toll/interleukin 1 receptor</i>)
TLR:	Receptor tipo Toll (del inglés <i>Toll like receptors</i>)
TNF:	Factor de necrosis tumoral (del inglés <i>Tumor necrosis factor</i>)
TRAF:	Factor asociado al receptor de TNF (del inglés <i>TNF receptor associated factors</i>)
TRIF:	Interferón β inductor del adaptador que contiene el dominio TIR (del inglés <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>)
TYK2:	Tirosina cinasa 2 (del inglés <i>tyrosine kinase 2</i>)
UTR:	Región no traducida (del inglés <i>untranslated región</i>)
WHO:	Organización mundial de la salud (del inglés <i>World Health Organization</i>)
WNV:	Virus del Nilo Occidental (del inglés <i>West Nile virus</i>)
XRN1:	Exoribonucleasa 1 (del inglés <i>exoribonuclease 1</i>)
YFV:	Virus de la fiebre amarilla (del inglés <i>yellow fever virus</i>)
ZIKV	Virus Zika (del inglés <i>Zika virus</i>)
ZPR:	Zika Puerto Rico

1. INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son un grupo de patógenos con ciclos de transmisión entre hospederos vertebrados y artrópodos hematófagos. Son un grupo taxonómicamente heterogéneo de más de 500 especies virales de diferentes familias (Arredondo-García et al., 2016). Una de las familias más importantes, es la *Flaviviridae*, cuyas especies de mayor importancia médica son los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV 1-4) y el virus Zika (ZIKV), ambos pertenecientes al género *Flavivirus*. Y son transmitidos por la picadura de la hembra hematófaga del género *Aedes*, principalmente las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, que se encuentran distribuidos en los trópicos y subtropicos del mundo. Recientemente, la distribución del vector de DENV y ZIKV, se ha incrementado debido a la adaptación del mosquito al entorno urbano, es decir, el vector se domesticó. Esto ha provocado el aumento de humanos infectados por DENV y ZIKV en todo el mundo. Al año se estima que el DENV, causa alrededor de 390 millones de infecciones en todo el mundo (WHO, 2019), en México durante el año del 2020, se notificaron 24,313 casos confirmados de dengue (Secretaria de Salud, 2020), mientras que el ZIKV desde su aparición en 2015 hasta el 2020, se han confirmado 12,955 casos de infección por el ZIKV en México (Secretaria de Salud, 2020), causando infecciones que van desde fiebre leve e inespecífica, hasta presentaciones graves de la enfermedad.

El sistema inmunológico innato es la primera línea de defensa del hospedero para suprimir la infección viral, mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) los cuales, al ser activados, desencadenan cascadas de señalización que culminan en la producción de interferones de tipo 1 (IFNs-I) y la subsecuente activación de miles de genes estimulados por interferón (ISGs), cuyos productos proteicos tienen efecto durante todo el ciclo replicativo de los virus. Sin embargo, la calidad e intensidad de la respuesta innata tiende a variar entre poblaciones, debido a la variabilidad genética seleccionada geográficamente (Kollmann, 2013) (Galanter et al., 2014) y México no es la excepción.

En México la población se caracteriza por tener una gran diversidad genética, por lo cual la respuesta inmunológica innata antiviral, frente a infecciones virales podría ser diferente, aún entre individuos de la misma población (García-Ramírez et al., 2015) (Galanter et al., 2014). Lo cual aunado a la competencia por el vector, genera múltiples presiones evolutivas en la población viral lo que da como resultado la selección positiva de cuasiespecies virales mejor adaptadas ("*fitness*"), posiblemente con mayor capacidad infectiva y/o de evasión del sistema inmunológico.

Desafortunadamente, se sabe poco acerca de las características en el fenotipo de las cuasiespecies virales seleccionadas en la población mexicana. Y la información existente, son estudios desarrollados en países, con un fondo genético más homogéneo entre individuos en comparación al presente en la población mexicana (Ooi et al., 2015). Con la finalidad de caracterizar aislados de *Flavivirus* seleccionados en población mexicana, en este estudio se llevó a cabo el aislamiento, purificación, tipificación molecular y titulación en unidades formadoras de placa (PFU) de 2 aislados de DENV (YUC 76 2016 y YUC 100 2016), obtenidos de muestras clínicas provenientes de pacientes del estado de Yucatán, con diagnóstico clínico y serológico de infección por *Flavivirus*, así como la determinación el fenotipo evasor de IFNs-I de los aislados de DENV obtenidos, utilizando dos líneas celulares: una deficiente en la producción de IFN-I endógeno (células Vero) y una productora de IFN-I (células HFF). Con los títulos obtenidos en la infección de ambas líneas celulares, se calculó el porcentaje de reducción de la infección en presencia de IFN-I endógeno y se comparó con el virus referencia *dengue serotipo 1 Western Pacific* (DENV1 WP) aislado de Naru en 1974 y adaptado al laboratorio (Mason, McAda, Mason, & Fournier, 1987). Nuestros resultados mostraron que DENV1 WP es un virus altamente citopático y con capacidad de evadir la presencia de IFNs-I endógenos, a diferencia del aislado YUC 76 2016 que además de evadir el IFN-I, fue capaz de mantener a las células vivas, logrando mayores títulos virales, sin embargo, es importante destacar, que el fenotipo de evasión de IFN-I del aislado YUC 76 2016 se evidenció, principalmente, en los últimos días de la cinética de infección, a diferencia de YUC 100 2016, cuyo fenotipo tampoco fue citopático, y presentó menor capacidad de evasión del IFN-I, aunque esto se vio revertido durante los últimos días de la cinética de infección.

Aunque el modelo propuesto sirvió para determinar el fenotipo de los aislados de Yucatán, se espera que se realicen experimentos por un método cuantitativo, además de determinar el mecanismo por el cual los aislados de *Flavivirus* obtenidos evaden el IFN-I y así como caracterizar aislados de otros estados de la república mexicana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de los *Flavivirus*

La familia *Flaviviridae*, engloba un grupo de patógenos virales responsables de causar enfermedades severas e incluso la muerte de miles de animales y humanos anualmente. La familia consiste en tres géneros: *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Flavivirus* (Mukhopadhyay, 2005). Siendo esta última una de las más importantes, dado que dentro de ella se encuentran el virus dengue (DENV), virus Zika (ZIKV), virus del Nilo Occidental (WNV), virus de la encefalitis Japonesa (JEV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV). Los cuales, de manera general, causan enfermedades agudas y autolimitadas, que pueden ser asintomáticas o presentarse como enfermedad febril no diferenciada que puede conducir a síntomas graves, como hemorragia severa, choque o complicaciones neurológicas graves, como meningitis o encefalitis (Neufeldt, C., 2018).

2.1.1. Epidemiología en México.

Se le denomina arbovirosis, a las enfermedades virales transmitidas por la picadura del mosquito hembra hematófaga perteneciente al género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) cataloga a las arbovirosis como problema prioritario en la salud (Martínez, M., 2017). En México, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 032-SSA2-2014, para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, se aconseja la vigilancia epidemiológica para los arbovirus DENV, WNV y Chikungunya (CHKV), además de la posible reemergencia del virus de YFV (Diario Oficial de la Federación, 2015).

El dengue es la enfermedad transmitida por artrópodos, con mayor importancia en México, debido a que se han reportado casos en casi todas las entidades federativas. Durante el 2020, fueron reportados 24,313 casos confirmados por dengue, de los cuales 19,172 casos fueron dengue no grave (DNG), 4,083 casos fueron dengue con signos de alarma (DCSA) y 1,058 fueron dengue grave (DG). Sin embargo, hubo 120,639 casos probables por dengue y un total de 79 defunciones. Además, se tipificaron los serotipos de 12,084 casos de dengue, predominando DENV-2 con 9,447 casos, seguido de DENV-1 con 2,533 casos, y en menor cantidad DENV-3 con 99 casos y DENV-4 con 5 casos, es decir, en México en 2020 co-circularon los cuatro serotipos, principalmente en los estados de Jalisco, San Luis Potosí, Tamaulipas, Michoacán y Nayarit (Figura 1) (Secretaría de Salud, 2020).

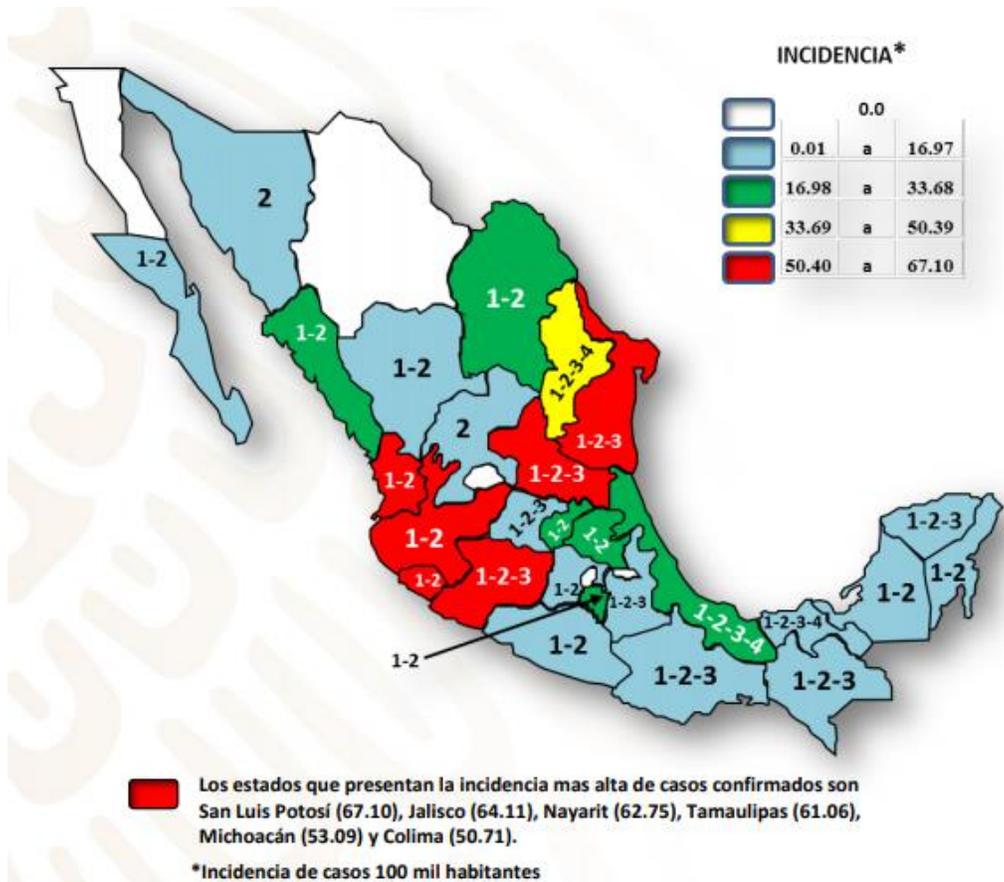


Figura 1. Incidencia y serotipos aislados de dengue por entidad federativa durante 2020 (Secretaría de salud, 2020).

Sin embargo, el ZIKV es otro arbovirus de importancia médica, no considerado en la NOM-032-SSA2-2014, debido a su reciente introducción al continente Americano en 2013 y en 2015 a México, cuando se reportó el primer caso autóctono de infección por ZIKV y desde entonces, se han confirmado hasta el 2020, 12,955 casos de infección encabezado por Veracruz con 2,105 casos y seguido de Yucatán con 1,325 casos. Además, se han reportado 7,137 casos de mujeres embarazadas con infección por ZIKV (Secretaria de Salud, 2020), representando un problema de salud pública por las complicaciones que puede ocasionar como el síndrome congénito asociado a la infección por ZIKV, causando microcefalia y en adultos se ha asociado con el síndrome de Guillain-Barre (Secretaria de Salud, 2017).

2.1.2. Importancia del vector

Los DENV y ZIKV, son importantes patógenos transmitidos a los seres humanos por la picadura de la hembra hematófaga *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* infectadas. Dichos artrópodos, se encuentran distribuidos en varios países del mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Figura 2) (Kraemer et al., 2015).

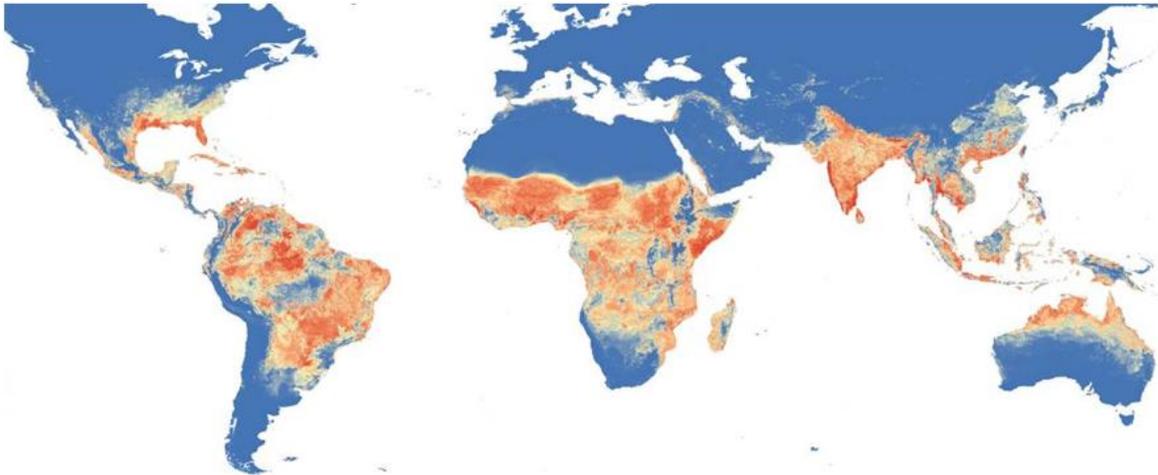


Figura 2. Distribución geográfica de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Kraemer et al., 2015).

Su distribución se ve afectada por variables climáticas como la lluvia y la temperatura, por lo que *Aedes aegypti* se encuentra en regiones con clima templado, a diferencia de *Aedes albopictus* que, además de habitar en regiones con clima templado, también sobrevive a bajas temperaturas.

2.2. Virus dengue

El virus del dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*, a la fecha se conocen 4 serotipos, denominados: dengue 1 (DENV-1), dengue 2 (DENV-2), dengue 3 (DENV-3) y dengue 4 (DENV-4) (Salles et al., 2018), los cuales son antigénica y genéticamente diferentes (Bustos-Arriaga et al., 2018).

2.2.1. Clasificación de la enfermedad del dengue

La Organización Mundial de la Salud clasificó la enfermedad del dengue según la gravedad del cuadro clínico, diferenciándose en tres categorías: dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave. Los síntomas se presentan con fiebre elevada (40°C) acompañada de otros signos y síntomas, en el caso de dengue sin signos de alarma se presentan náuseas o vómito, erupción cutánea, leucopenia y prueba del torniquete positivo; en el dengue con signos de alarma se presentan vómitos persistentes, acumulación clínica de líquidos, sangrado de mucosas, letargia, hepatomegalia y aumento del hematocrito con disminución del conteo de plaquetas; sin embargo, la enfermedad puede progresar a dengue grave y es potencialmente mortal, por lo que se clasifica de acuerdo al grado de severidad, cursando con extravasación de plasma (donde se presenta el síndrome de choque por DENV (SSD, por sus siglas en inglés), hemorragia grave y compromiso de órganos (WHO, 2009).

La infección con cualquiera de los cuatro serotipos de dengue puede producir todo el espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad. La historia natural de la

infección se divide en tres distintas fases (Figura 3): la fase febril, donde el individuo presenta IgM/IgG en sangre, además de fiebre alta impulsada por la viremia; seguida de la fase crítica, cuando los signos y síntomas pueden agravarse, o bien, seguir a la fase de convalecencia o reabsorción, durante la cual se experimenta la retención repentina de plasma con reabsorción concomitante de plasma y fluidos extravasados (CDC, 2019).

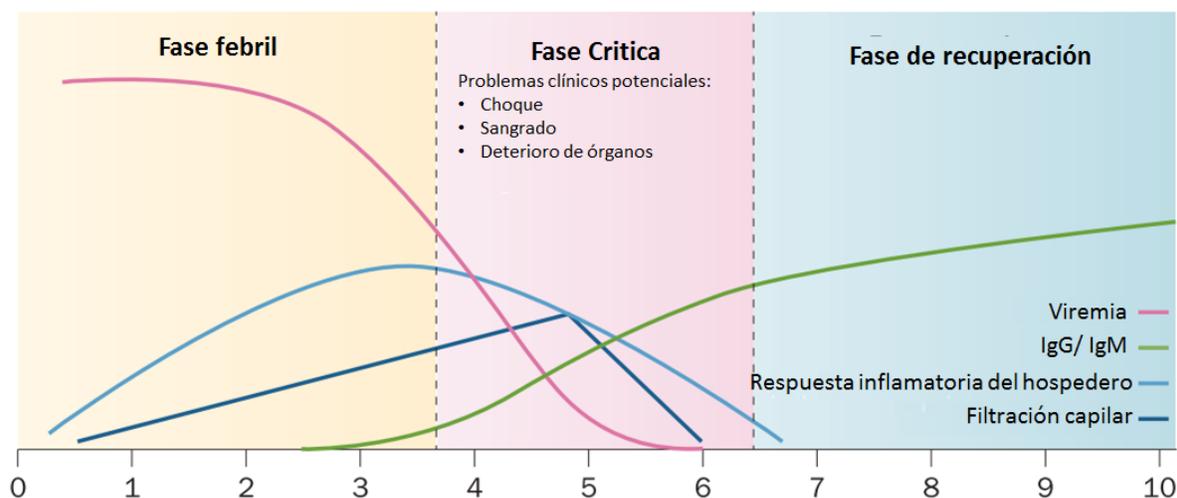


Figura 3 . Curso clínico del dengue, que muestra las 3 distintas fases (Yacoub, S., 2014).

2.3. Virus Zika.

El ZIKV también pertenece a la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus*, y posee tres genotipos distintos: el Asiático, Africano I y Africano II (Gong, Gao, & Han, 2016). Es un virus filogenéticamente relacionado con dengue, y poseen estructura similar.

2.3.1. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La enfermedad causada por la infección con el ZIKV en la mayoría de los casos es asintomática. En las infecciones sintomáticas se reporta fiebre con erupción maculopapular, artralgia y en ocasiones, conjuntivitis, entre otros síntomas poco comunes como mialgia y dolor de cabeza. Estos perduran de 2 a 7 días, seguido de la resolución de la enfermedad (CDC, 2017). Sin embargo, se ha asociado al ZIKV el síndrome congénito generando complicaciones como aborto espontáneo, microcefalia y serias anomalías cerebrales (Cao, Diamond, & Mysorekar, 2017). Además, también se ha asociado al síndrome de Guillain-Barré como una complicación poco frecuente (Secretaría de Salud, 2016). El síndrome de Guillain-Barré es una enfermedad autoinmune que afecta el sistema nervioso periférico, causando debilidad muscular y pérdida de la sensibilidad (WHO, 2016).

2.3.2. Vías de infección del virus Zika

La manera más común de contraer el virus es por la picadura de la hembra hematófaga del género *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Pero se ha observado que puede ser transmitido por contacto sexual y persistir en el tracto genital masculino, alojándose en testículos, epidídimo y en la próstata, logrando detectarse por RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) en semen hasta 370 días después de la aparición de los síntomas de la enfermedad (Kurscheidt et al., 2019).

Por otro lado, en la mujer infectada por ZIKV, también se ha detectado la presencia en secreciones vaginales. Y en mujeres embarazadas, ocurre la transmisión vertical al producto, este puede ocurrir en cualquier punto del embarazo. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual el ZIKV atraviesa la barrera placentaria (Cao, Diamond, & Mysorekar, 2017).

2.4. El virión flaviviviral.

La partícula viral (Figura 4) tiene un tamaño aproximado de 50 nm y está constituido por una sola cadena de RNA de polaridad positiva con un solo marco de lectura abierto (ORF), empaquetado por la proteína de cápside y recubierta por una envoltura constituida de la membrana celular derivada de la célula hospedadora y por proteínas estructurales E/M virales. El genoma es transcrito como poliproteína la cual es procesada co- y post-traduccionamente, dando como resultado 3 proteínas estructurales: cápside (C), proteína precursora de membrana (prM) y proteína de envoltura (E), las cuales forman a la partícula viral. Además, son producidas siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, encargadas de la replicación viral y evasión del sistema inmunológico (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005).

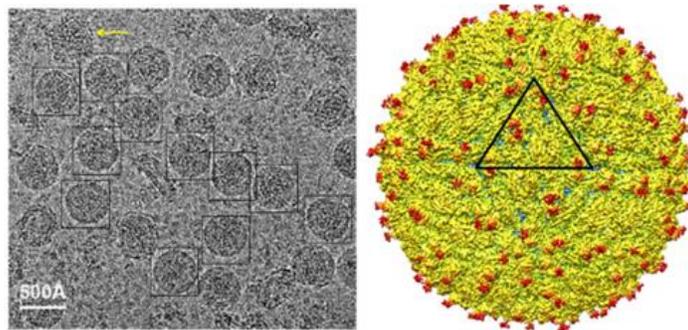


Figura 4 . Estructura criomicroscopia del virus Zika (Sirohi et al., 2016).

2.4.1. Genoma de *Flavivirus*.

El genoma Flaviviral es una sola cadena de RNA (ssRNA) en sentido positivo de aproximadamente 10.8 kb de longitud (Figura 5), el cual contiene toda la información genética requerida para completar el ciclo replicativo (Mazeaud, Freppel, & Chatel-Chaix, 2018). En el extremo 5' cuenta con un cap tipo I y una región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) (5'-UTR), un único marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) y un 3'-UTR (Klema, Padmanabhan, & Choi, 2015). La función del cap es proteger el genoma Flaviviral, de exonucleasas celulares como la XRN1, así como estimular la iniciación de la traducción viral mediante el reclutamiento de subunidades del ribosoma, además, es posible que el cap tenga la función de mimetismo de evasión del reconocimiento por PRRs (Bradrick, 2017). Los extremos 5' y 3' UTR contienen importantes estructuras secundarias para la replicación viral, como la circularización del genoma para su traducción (Mazeaud, Freppel, & Chatel-Chaix, 2018). El ORF viral contiene el gen que codifica para la poliproteína viral, la cual es escindida por proteasas virales y celulares para dar origen a 3 proteínas estructurales que conforman la partícula viral, y siete proteínas no estructurales que participan en la replicación viral (Klema, Padmanabhan, & Choi, 2015).

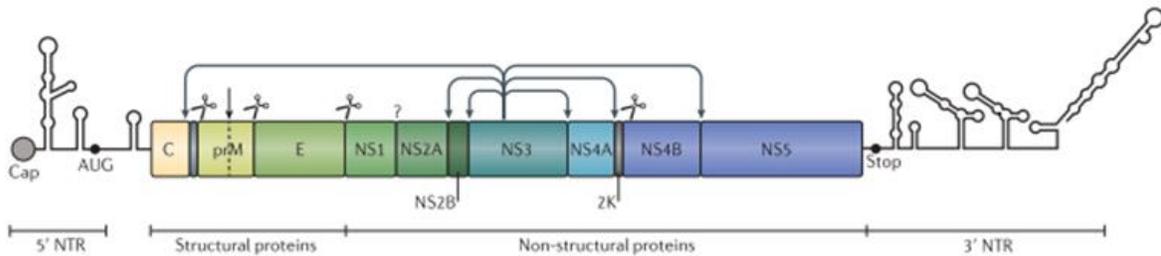


Figura 5. Esquema del genoma de los *Flavivirus* (Neufeldt, Cortese, Acosta, & Bartenschlager, 2018).

2.4.2. Proteínas estructurales.

Las proteínas estructurales constituyen la partícula viral y las conforman: la proteína de cápside (C), proteína de membrana (M) y la proteína de envoltura (E). La proteína C consiste de aproximadamente 100 aminoácidos, organizados en cuatro α -hélices conservadas estructuralmente y un dominio hidrofóbico interno, está involucrado en el empaquetamiento del genoma viral, debido a su afinidad por el RNA viral y la membrana lipídica, para formar la nucleocápside (NC). La proteína M es el resultado del procesamiento de la proteína precursora de membrana (prM) de aproximadamente 165 aminoácidos, organizados en siete cadenas β , cuya función es prevenir la fusión prematura de la proteína E en los compartimentos celulares. La proteína E de aproximadamente 495 aminoácidos, está organizada en dímeros (en pH neutro) y en trímeros (en pH ácido) y su función es la unión al receptor, para

promover la endocitosis mediada por receptor (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005) (Cedillo-Barrón et al., 2018).

2.4.3. Proteínas no estructurales (NS).

Las proteínas no estructurales son: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, solo se encuentran en las células infectadas y son esenciales para la replicación viral. La NS1 es una proteína multifuncional, dentro de la célula infectada actúa como cofactor para la replicación, además es secretada como hexámero y desempeña el papel de evasión inmunológica y en la patogénesis (Puerta-Guardo et al., 2019). NS2A es una proteína transmembranal hidrofóbica que se ubica en la bicapa lipídica del retículo endoplasmático (ER), desempeña un papel importante durante la replicación, ensamblaje y secreción de viriones y posiblemente en el efecto citopático inducido por el virus (CPE) (Wu et al., 2017). NS2B es una proteína viral integral de membrana que posee una región central conservada hidrofóbica, e interactúa estrechamente con la proteína NS3 para realizar la función de proteasa, durante el procesamiento de la poliproteína viral (Luo, Vasudevan, & Lescar, 2015). Adicionalmente la NS3, tiene un dominio C-terminal con actividad de RNA helicasa, indispensable durante la replicación viral. La NS4A es una proteína hidrofóbica que consta de cuatro hélices transmembranales y una región citosólica que se ubica en el ER y participa en el reordenamiento de la membrana, lo que sugiere que NS4A direcciona el sitio de acoplamiento del complejo replicativo, debido a que colocaliza con dsRNA (RNA de doble cadena) y la proteína NS1 (McLean, Wudzinska, Datan, Quaglino, & Zakeri, 2011). La NS4B es una proteína hidrofóbica con cinco dominios transmembranales ubicados en el lumen del ER, los cuales tienen actividad antagonista del sistema inmunológico innato y participa en el ensamblaje del complejo replicativo. La NS5 es la proteína más conservada entre *Flavivirus*, con el 60% de homología, está organizada en dos dominios funcional y estructuralmente diferentes, donde, el extremo amino terminal, desempeña la función de metiltransferasa durante la síntesis del Cap en los genomas virales, mientras que el dominio carboxilo terminal contiene un dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) involucrado en el proceso de replicación (Cedillo-Barrón et al., 2018).

2.5. Ciclo replicativo

El ciclo replicativo inicia cuando el virión se adhiere a la superficie de la célula hospedera (Figura 7), debido a la unión específica de la glicoproteína E viral, con el receptor celular. Se han reportado múltiples receptores primarios en diversos linajes celulares, como son DC-SIGN en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos (MDDC) humanos (Navarro-Sanchez et al., 2003), GRP78/BiP en células hepáticas humanas (HepG2) (Jindadamrongwech, Thepparit, & Smith, 2004) y CD14 en células de monocitos y macrófagos humanos (Chen, Wang, & King, 1999), esta interacción desencadena el proceso de endocitosis mediada por receptor.

resultado partículas maduras e infecciosas, que son exocitadas (Figura 6) (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005).

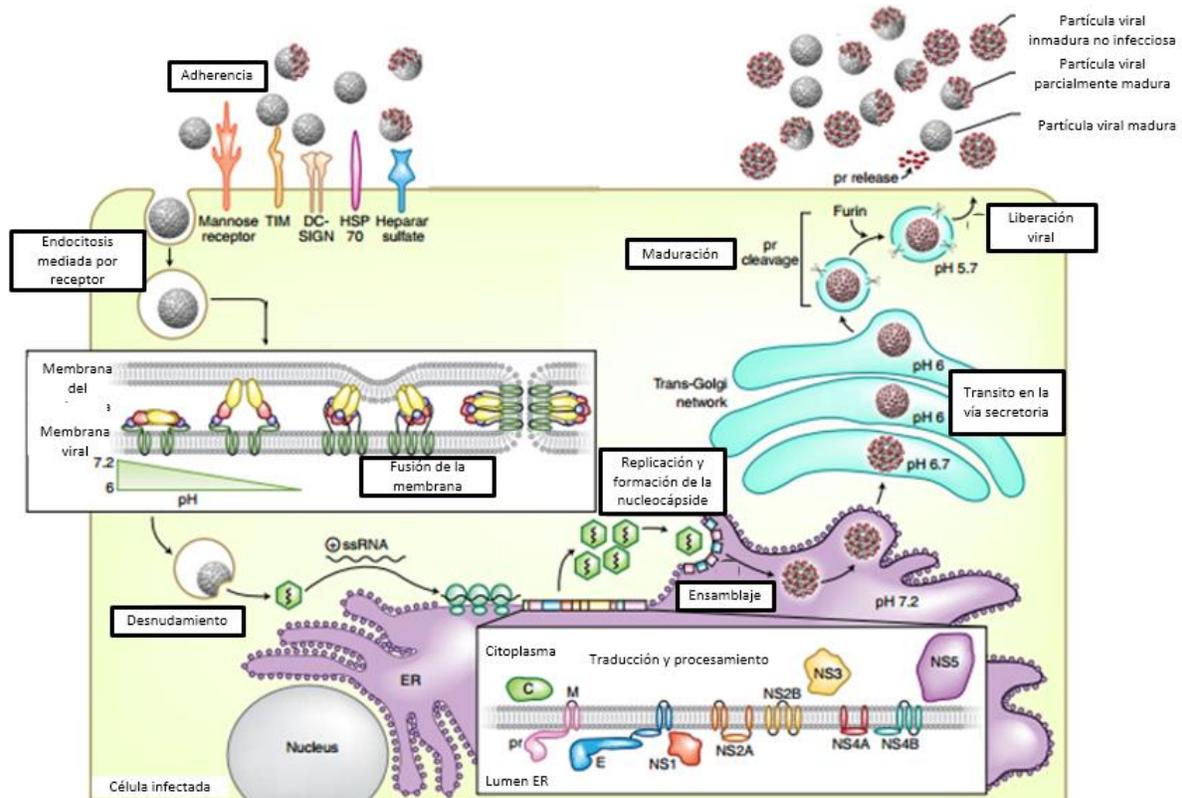


Figura 7. Ciclo replicativo de los *Flavivirus* (Campos, Mongkolsapaya, & Screaton, 2018).

2.6. Sistema inmunológico innato antiviral.

Debido a que el ciclo replicativo viral, tiene lugar en el citoplasma, el sistema inmunológico innato, constituye la primera línea de defensa antiviral, que impide, controla o elimina la diseminación de la infección en el hospedero. Por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que pueden estar constituidos por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos. Los PRRs activan vías intracelulares de transducción de señales e inducen varias respuestas celulares, como la producción de moléculas que promuevan la inflamación y la destrucción de patógenos. Los PRRs están organizados en dos diferentes familias: los receptores tipo toll (TLR's) endosomales o unidos a la membrana plasmática, y los receptores citoplasmáticos conocidos como Helicasas tipo RIG-1 (RLHs) que incluyen a (RIG-I) (receptor inducido por ácido retinoico) y a MDA5 encargados de detectar la presencia de ácidos nucleicos en el citoplasma (Cedillo-Barrón et al., 2018) (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015).

2.6.1. Receptores tipo toll (TLR)

Los TLR's son glucoproteínas integrales de membrana que contienen repeticiones ricas en leucina flanqueadas por estructuras ricas en cisteína en sus regiones extracelulares, que participan en la unión al ligando y un dominio Toll/receptor de interleucina 1 (IL-1) (TIR), la cola citoplasmática para la transducción de señales (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015). Los TLR3, TLR7 y TLR8 (Figura 8) son los principales receptores de detección de PAMPs virales debido a su ubicación intracelular en el compartimento endosomal. Una vez que el ligando se une al TLR, pueden seguirse dos vías de señalización dependiendo del TLR. La primera vía es dependiente de TLR3, el cual fosforila y activa el complejo de cinasa IRF3/7 a través de TRIF-TRAF3/ TBK1/ IKK, para promover la transcripción de genes de IFN-I. La segunda vía es dependiente de TLR 7/8 a través de MyD88, el cual activa NF- κ B a través de la vía IRAKs-TRAF6-IKK, para la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL-8, IL-6, IL-1 β y TNF) (Cedillo-Barrón et al., 2018).

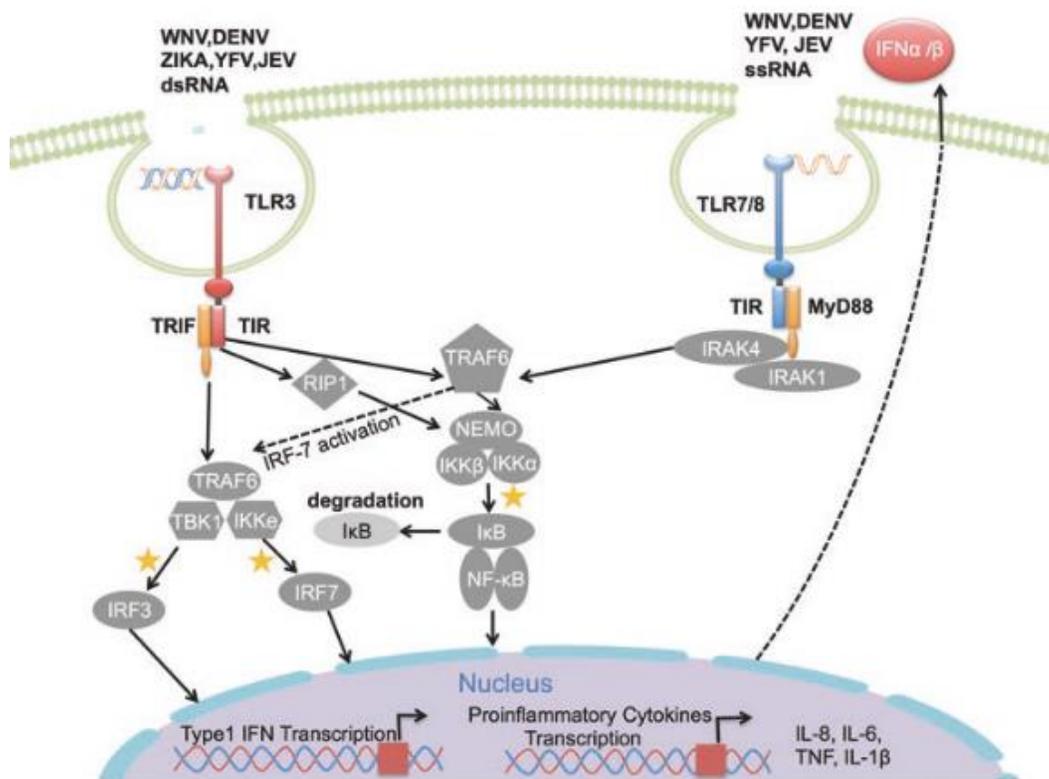


Figura 8. Esquemización de la vía de activación de TLRs (Cedillo-Barrón et al., 2018).

2.6.2. Helicinas tipo RIG-I (RLRs)

Los RLRs son receptores citoplasmáticos solubles, involucrados en el reconocimiento de RNA viral (Figura 9) (Miorin, Maestre, Fernandez-Sesma, & García-Sastre, 2017). Entre ellos se encuentran RIG-I, encargado del

reconocimiento de ssRNA y dsRNA corto, mientras que MDA5 reconoce dsRNA largo (Suthar, Aguirre, & Fernandez-Sesma, 2013). Una vez que dichos receptores se unen a su ligando, ocurren cambios conformacionales exponiendo dos dominios de reclutamiento de activación de caspasas (CARD), los cuales interactúan con dominios CARD presentes en la proteína adaptadora de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), para activar proteincinasas encargadas de la fosforilación de los factores de transcripción IRF3/7, lo que induce la transcripción de genes de IFN-I y la consecuente inducción del estado antiviral (Suthar, Aguirre, & Fernandez-Sesma, 2013).

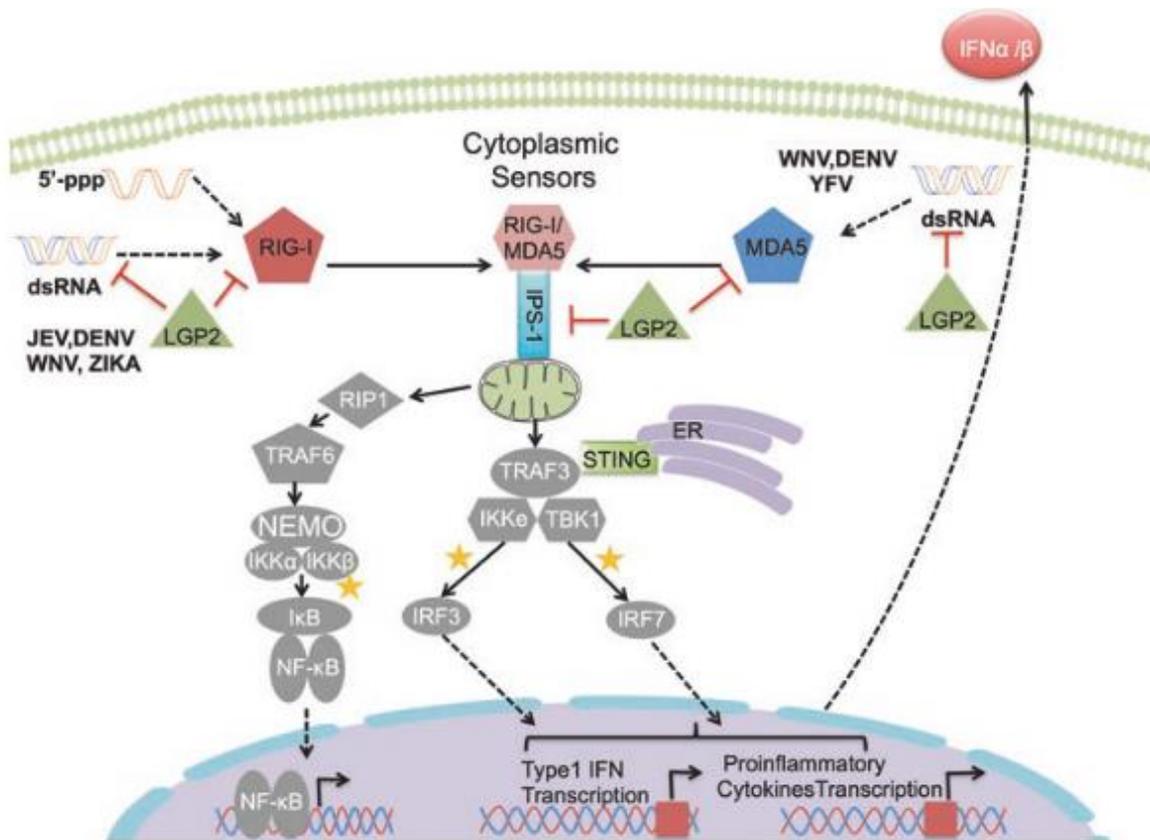


Figura 9. Esquemización de la vía de activación de RIG-I (Cedillo-Barrón et al., 2018).

2.7. Respuesta antiviral por interferones

En el caso de infecciones virales, los PRRs son los encargados de la vigilancia intracelular, desencadenando vías de señalización, dando como resultado inflamación e inducción de la producción de IFN-I. Los IFNs-I son citocinas con actividad autocrina y paracrina, cuya función es inducir un microambiente antiviral. (Bandurska, Król, & Myga-Nowak, 2014). Dentro de los IFNs-I, se encuentran los IFN- α que incluyen 13 citocinas, un IFN- β , un IFN- ϵ , un IFN- κ y un IFN- ω , todos diferentes, pero con una alta homología estructural. Una vez secretados, los IFNs-I se unen a su receptor compartido (IFNAR), conformado por dos subunidades,

IFNAR1 e IFNAR2, los cuales interactúan con la cinasa asociada a Janus (JAK) y la tirosincinasa 2 (TYK2), para fosforilar los factores de transcripción, transductor de señales y activador de transcripción (STAT) 1 y STAT2, lo que conlleva a la disociación de los factores de transcripción del receptor, su unión a proteínas de unión al DNA, como IRF9 formando un complejo heterotrimérico denominado factor 3 de los genes estimulados por interferón (ISGF3) que se transloca al núcleo. El complejo induce la transcripción de miles de genes estimulados por interferón (ISGs), cuyos productos proteicos están involucrados en la respuesta de la inmunidad innata antiviral, generando proteínas como la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), proteína cinasa dependiente de RNA (PKR), viperina, entre otras, que tienen efecto inhibitorio en diferentes etapas del ciclo replicativo viral (Figura 10) (Klotz & Gerhauser, 2019).

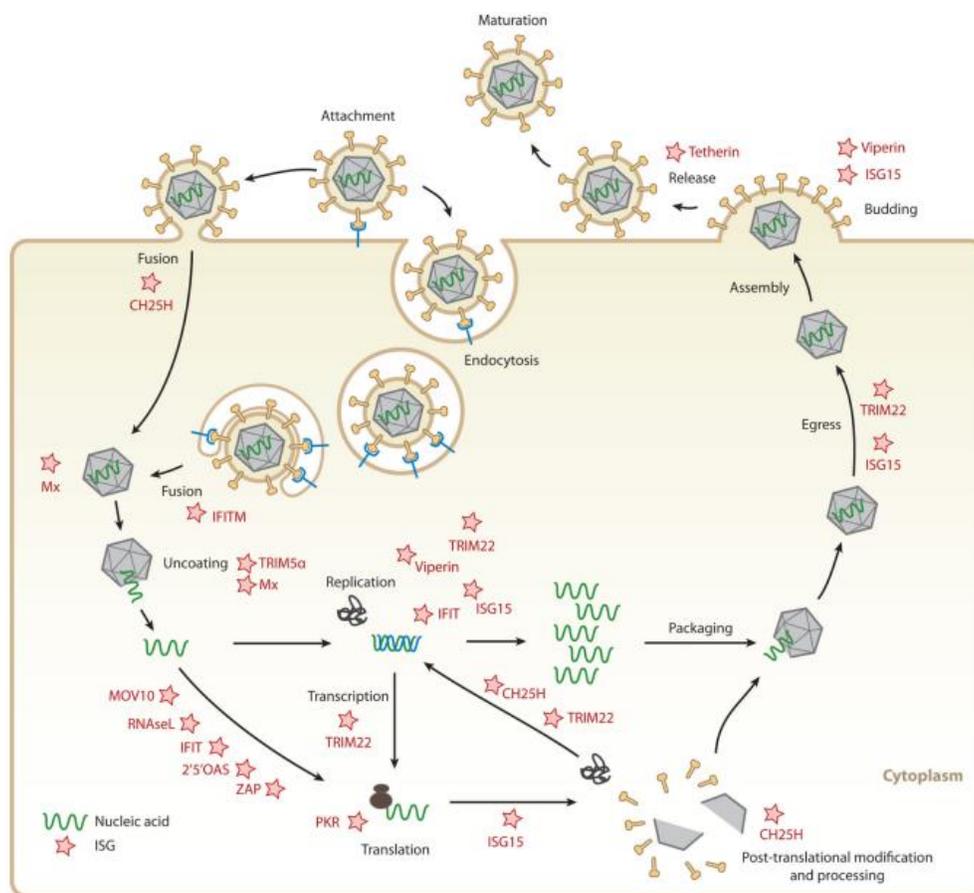


Figura 10. Efecto antiviral de ISGs (Malterer, Glass, & Newman, 2014).

2.7.1. Evasión del sistema inmunológico innato por los *Flavivirus*.

La respuesta antiviral de los IFNs-I es muy eficiente, sin embargo, los *Flavivirus* han evolucionado para evadirla a nivel de producción de IFNs-I o de actividad antiviral de los ISGs; en el caso de DENV se han descrito dos mecanismos: 1° consiste en

inhibición activa, es decir, alterando las moléculas de señalización presentes en la vía de señalización para producción de interferón; 2° consiste en inhibición pasiva, la cual consiste en evitar el reconocimiento del virus, por los PRRs (Castillo Ramirez & Urcuqui-Inchima, 2015).

2.7.1.1. Inhibición activa.

La inhibición activa de la producción de IFN-I, constituye el principal mecanismo de evasión del sistema inmunológico innato del hospedero. Múltiples estudios, han demostrado que las proteínas no estructurales NS2A, NS4A, NS4B y NS5 virales, juegan un papel importante en la interrupción de la vía de señalización JAK/STAT, disminuyendo la producción de IFNs-I (Cedillo-Barrón et al., 2018). Ejemplo de ello, es NS2B que se asocia a STAT1 impidiendo su fosforilación, además de promover, en conjunto con NS5, la degradación proteosomal dependiente de ubiquitinación de STAT2 (Miorin, Maestre, Fernandez-Sesma, & García-Sastre, 2017). En el caso de la vía de señalización por RIG-I/MDA5, la proteasa viral NS2B3 degrada directamente a la proteína estimuladora de genes de interferón (STING) necesaria para activar la señalización dependiente de helicasas tipo RIG-I (RLHs) (Castillo Ramirez & Urcuqui-Inchima, 2015).

Además de las proteínas NS de los *Flavivirus*, se ha observado que el RNA subgenómico (*sfRNA*), producido por la degradación incompleta 5' – 3' del genoma viral por la exonucleasa celular XRN1, generando fragmentos en el intervalo de 0.3 – 0.7 kb de longitud, también presentan actividad antagónica de la respuesta inmunológica innata interfiriendo la vía de señalización para la producción de IFN-I, ejemplo de ello, es su interacción con la ubiquitina ligasa E3 TRIM25, impidiendo la poliubiquitinación ligada a K63 de RIG-I y de esta manera inactivándolo (Mazeaud, Freppel, & Chatel-Chaix, 2018). Además, el *sfRNA* también se ha ligado con la inhibición en la expresión de ISGs a nivel pos- transcripcional, debido a su asociación con proteínas de unión a RNA (RBP) como G3BP1, G3BP2 y CAPRIN1, involucradas en la traducción de ISGs (Bidet, Dadlani, & Garcia-Blanco, 2014)

2.7.1.2. Inhibición pasiva

Existen dos mecanismos pasivos utilizados por los *Flavivirus* para evadir los PRRs. La primera estrategia, está implicada la estructura Cap, la cual impide que el RNA viral sea reconocido por proteínas inducidas por interferón con repeticiones tetratricopéptido (IFIT), lo que llevaría a la degradación del RNA viral. Mientras que la segunda consiste en la manipulación de la membrana lipídica del ER, para proteger los intermediarios de replicación, de los PRRs citoplasmáticos (Miorin, Maestre, Fernandez-Sesma, & García-Sastre, 2017).

3. Antecedentes directos

Se conocen como cuasiespecies a las poblaciones virales de RNA que consisten en espectros de mutantes (o nube de mutantes), es decir, los genomas virales producidos durante la replicación viral con mutaciones puntuales generadas por la ausencia de capacidad de revisión y a la alta tasa de mutación de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp o NS5) estimada entre 10^{-3} y 10^{-5} , lo que significa que en el caso de los *Flavivirus* existe aproximadamente una mutación por genoma replicado (Griesemer et al., 2017) (Domingo, Sheldon, & Perales, 2012). Las cuasiespecies generadas, compiten entre sí, para infectar y prevalecer durante la infección, generando presiones evolutivas, dando como resultado la selección de cuasiespecies predominantes en la población viral. Algunas de las presiones evolutivas más astringentes a las que se enfrentan los *Flavivirus* son la respuesta inmunológica del hospedero humano y la respuesta inmunológica del vector, lo que genera cuasiespecies con mayor “fitness” (adaptabilidad) (Domingo, Sheldon, & Perales, 2012).

En el caso del DENV, se ha observado que la generación de cuasiespecies está relacionada con la aparición de epidemias, por el desplazamiento de un serotipo por otro, o hasta de un genotipo por otro. Evidencia de ello, es el estudio realizado por Ooi et al., en el cual observaron que, durante la epidemia de 1994 en Puerto Rico, se aislaron tres clados diferentes denominados PR-1 (predominó de 1986 - 1995), PR-2A (estuvo en niveles bajos hasta 1998) y PR-2B (prevalente de 1995 - 2007). Siendo este último, el que desplazó a PR-1, debido a la capacidad de supresión de la expresión de IFN- β (Ooi et al., 2015).

De manera similar a Puerto Rico, se observó que México durante el periodo de 2000 - 2005, el serotipo que predominaba era DENV-2, y este se vio desplazado por el serotipo DENV-1 desde el 2006 - 2012 (Dantés, Farfán-Ale, & Sarti, 2014). Esto probablemente debido a la adaptabilidad (“fitness”) evolutiva de las variantes de DENV-1 seleccionadas por la presión evolutiva de la población mexicana, que a su vez depende de la variabilidad genética. Se ha observado que la diversidad genética entre poblaciones geográficamente separadas en México es tan diferente como la de un europeo con un asiático oriental, dicha variabilidad podría determinar la calidad y duración de la respuesta inmunológica contra infecciones virales de cada individuo, generando cuasiespecies características en las diferentes poblaciones endémicas (García-Ramírez et al., 2015) (Galanter et al., 2014). Para determinar si existe diferencia en la capacidad de evasión de la respuesta innata entre aislados de la misma región geográfica, en este proyecto caracterizamos el fenotipo evasor de la respuesta inmunológica dependiente de IFNs-I de aislados de *Flavivirus*, seleccionados en Yucatán, México y lo comparamos con virus referencia.

4. JUSTIFICACIÓN

Los estudios que describen los mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica se han realizado con *Flavivirus* seleccionados de poblaciones de regiones geográficas diferentes a la mexicana, por lo que no se conocen las variantes genéticas que se seleccionan en nuestro país. Se sabe que la población mexicana cuenta con una elevada diversidad genética (Galanter et al., 2014) por lo que es probable que las variantes seleccionadas en las regiones endémicas de nuestro país sean diferentes a las observadas en *Flavivirus* circundantes en poblaciones con diferente fondo genético al mexicano.

5. HIPÓTESIS

Los aislados en Yucatán, México de *Flavivirus* presentarán diferente fenotipo evasor de la respuesta inmunológica innata dependiente de IFNs-I.

6. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el fenotipo de evasión de la respuesta de interferones de tipo I (IFN-I), de aislados clínicos de *Flavivirus* provenientes de pacientes con diagnóstico clínico o serológico del estado de Yucatán.

6.1. Objetivos particulares

- Obtener aislados de *Flavivirus* en cultivo celular usando la línea VERO de riñón de mono verde, a partir de sueros de pacientes con diagnóstico clínico o serológico de infección por *Flavivirus* durante la fase febril (3-7 días).
- Realizar preparaciones virales purificadas de los aislados de *Flavivirus* y determinar su título viral por inmunocitoquímica en unidades formadoras de placa (PFU).
- Realizar la tipificación de las muestras por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para DENV y ZIKV.
- Evidenciar la infección en el modelo celular de la línea Vero y HFF, por la técnica de inmunofluorescencia.
- Comparar la susceptibilidad de los aislados de *Flavivirus* a la presencia de interferones de tipo 1 endógenos en cultivo celular.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Muestras

Se utilizaron 14 muestras de pacientes de diferente sexo y edad, con diagnóstico presuntivo de infección por *Flavivirus* durante la temporada de 2016, recolectadas al momento en que se presentaron al Hospital General Agustín O'Horán ubicado en Mérida Yucatán (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas de las muestras utilizadas

Código	Fecha	Registro	Edad	Sexo	Servicio	Días de fiebre	Dengue IgM	Dengue IgG	Diagnóstico clínico
002	22/01/2016	D16-002B	23 AÑOS	MASCULINO	AMBULATORIO	3 DIAS	NEGATIVO	NEGATIVO	
004	22/02/2016	D16-004B	12 AÑOS	FEMENINO	URG. PED.	4 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
006	30/06/2016	D16-006B	7 AÑOS	MASCULINO	PEDIATRIA	3 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
076	27/09/2016	D16-076B	23 AÑOS	FEMENINO	AMBULATORIO	4 DIAS	NEGATIVO	POSITIVO	DENGUE
089	29/09/2016	D16-089B	40 AÑOS	MASCULINO	AMBULATORIO	5 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
100	04/10/2016	D16-100B	39 AÑOS	FEMENINO	AMBULATORIO	4 DIAS	NEGATIVO	POSITIVO	DENGUE
125	13/10/2016	D16-125B	24 AÑOS	FEMENINO	AMBULATORIO	5 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
131	17/10/2016	D16-131B	23 AÑOS	FEMENINO	AMBULATORIO	4 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
134	18/10/2016	D16-134B	16 AÑOS	FEMENINO	URG. ADULTOS	8 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
140	19/10/2016	D16-140B	24 AÑOS	MASCULINO	AMBULATORIO	3 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
141	20/10/2016	D16-141B	22 AÑOS	MASCULINO	AMBULATORIO	1 DIA	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
173	08/11/2016	D16-173B	42 AÑOS	FEMENINO	AMBULATORIO	2 DIAS	POSITIVO	POSITIVO	DENGUE
181	18/11/2016	D16-181B	23 AÑOS	FEMENINO	AMBULATORIO	4 DIAS	NR	NR	
185	29/11/2016	D16-185B	25 AÑOS	FEMENINO	AMBULATORIO	2 DIAS	NR	NR	

En el caso de dos pacientes, no se realizaron (NR) estudios serológicos IgM e IgG anti-DENV, sin embargo, presentaron la sintomatología clínica al momento de la toma de muestra.

7.2. Virus

Se utilizaron como controles positivos virus referencia disponibles en el laboratorio: dengue-1 *Western Pacific* (DENV1 WP), aislado en 1974, (Mason et al., 1987) con número de acceso a Genbank AY145121.1, DENV4 aislado en 1981 (Reynolds et al., 2001) con número de acceso a Genbank AY648301.1 y Zika Puerto Rico (ZIKV PR) aislado en 2016 (Yun et al., 2016) con número de acceso a Genbank KX377337.1.

7.3. Líneas celulares.

Se utilizó la línea celular Vero, células epiteliales adherentes provenientes de riñón de mono verde, mantenidas con medio RPMI (Gibco) al 3% de suero fetal bovino (Gibco) en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y la línea celular HFF, células de

fibroblastos adherentes provenientes de piel humana, mantenidas en medio DMEM (Gibco) al 5% de suero fetal bovino (Gibco) en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

7.4. Amplificación y purificación de preparaciones virales de aislados de *Flavivirus*.

Se realizaron pases ciegos de las muestras de suero sanguíneo, obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico de infección por *Flavivirus* (Tabla 1) y se inoculó la monocapa de células Vero con suero del paciente, diluido 1:40 en medio RPMI base, manteniendo la infección en incubación hasta observar efecto citopático en la monocapa celular. Una vez observado el efecto citopático, se recuperó todo el sobrenadante del cultivo celular y se fraccionó en microtubos en volúmenes de 100 µl, rotulándolos con el número asignado desde el inicio de la toma de muestra, seguido del número de pase ciego (abreviado “p”) y se almacenó a -70°C. Una vez que el efecto citopático en el cultivo celular se daba en un tiempo menor a 4 días, se recuperó todo el sobrenadante y se clarificó por centrifugación a 2000 rpm/ 5 min/ 4°C, y se crioprotegió con estabilizador de sacarosa, fosfato y glutamato (SPG), para posteriormente fraccionarlo en microtubos en volúmenes de 100 µL, correctamente rotulados y se almacenó a -70°C, hasta su uso.

7.5. Titulación de Unidades Formadoras de Placa por inmunocitoquímica.

Se obtuvo el título viral de los sobrenadantes de las muestras que indujeron efecto citopático en el cultivo celular en un tiempo de incubación menor a 5 días. Se inocularon diluciones decimales seriadas de los sobrenadantes de los pases ciegos se inocularon en monocapas de células Vero, manteniéndolas con medio semisólido con 1% de metil-celulosa, 2% de SFB en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C, durante cuatro días. Posteriormente se fijó la monocapa con metanol al 80% (Reactivos química Meyer), se bloqueó y se realizó inmunocitoquímica agregando a la monocapa el anticuerpo primario 4G2 (diluido 1:2000), el cual reconoce el péptido fusogénico de la proteína de envoltura (E) de los flavivirus, se incubó durante 1 hr a 37°C. Concluido el tiempo se retiró el anticuerpo primario y se eliminó el exceso realizando lavados con PBS. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario desarrollado en cabra, anti-ratón IgG H+L acoplado a peroxidasa de rábano (KPL) (en una dilución 1:2000) por 1 hr a 37°C. Transcurrido el tiempo, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron lavados con PBS, para finalmente, revelar las placas, utilizando el sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina y H₂O₂ (True Blue KPL). Las unidades formadoras de placa fueron contadas manualmente. El conteo se realizó en los pozos con más de 3 placas y menos de 30 placas. El título viral, se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral (PFUs/mL)} = \log(\text{promedio de placas} \times 10^{(\text{dilucion} + 1)})$$

7.6. Tipificación molecular

Se realizó la extracción del RNA viral de las muestras por la técnica de fenol-cloroformo. Donde a una fracción de la preparación viral, se incubó con la solución monofásica de fenol RiboZol™ (VWR) (relación 1:1) y se agitó, dejándolo reposar durante 10 minutos. Posteriormente se agregó cloroformo (Reactivos química Meyer) al 99.8% (relación 1:5 al volumen agregado de RiboZol™) y se agitó hasta obtener una solución heterogénea con apariencia lechosa, la cual se centrifugó a 13,000 rpm/ 15 minutos/ 4°C, para separar la fase orgánica (contiene lípidos y proteínas) y la interfase (contiene DNA) de la fase acuosa (contiene RNA), se recuperó la fase acuosa sin tocar la interfase formada y se transfirió a un microtubo nuevo. Al volumen recuperado se le agregó 250 µL de isopropanol (J. T. Baker®) al 99.5% y se centrifugó a 13,000 rpm/ 10 minutos/ 4°C, desechando el sobrenadante y lavando por duplicado la pastilla con etanol al 70%, centrifugando entre cada lavado a 13,000 rpm/ 10 minutos/ 4°C y a 13,000 rpm/ 5 minutos/ 4°C, respectivamente. Para eliminar la mayor cantidad de etanol de la muestra, se dejó secar durante 30 minutos y se resuspendió en 10 µL de agua inyectable, para su posterior cuantificación y evaluación de la integridad (relación 260/280 y 260/230) por espectrofotometría en el equipo IMPLEN NanoPhotometer® NP80.

Una vez extraída la muestra de RNA, se realizó la síntesis de cDNA por retrotranscripción, agregando a un microtubo 6.1 µL de agua, 0.6 µL de hexámeros aleatorios (3µg/µL) (Thermo scientific), 1 µL de dNTPs (10 mM) (Thermo scientific) y 8 µL del RNA extraído (aproximadamente 1000 ng), manipulando todo en hielo. La reacción de desnaturalización se llevó al termociclador a 65°C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se agregó 4 µL de buffer RT (Thermo scientific) al 5x y 0.3 µL de retrotranscriptasa de leucemia murina de Maloney (200 U/µL) (Thermo scientific), agitando perfectamente y centrifugando la reacción, para colocarla en el termociclador. La reacción de síntesis se realizó con las siguientes condiciones: 25°C/ 10 minutos, 42°C/ 60 minutos, 70°C/10 minutos y 4°C/ ∞ tiempo. Las muestras se cuantificaron y almacenaron a -20°C si no se usan inmediatamente.

Con el cDNA sintetizado, se procedió a la tipificación de los aislados por PCR, con oligonucleótidos específicos para DENV y ZIKV (Tabla 3), en reacciones separadas. Se agregó en un microtubo 1 µL de buffer de Taq polimerasa (Thermo scientific), 0.5 µL de MgCl₂ (25 mM) (Thermo scientific), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.3 µL de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) (10 mM), el volumen de cDNA requerido para 1 µg, 0.2 µL de enzima Taq polimerasa (5 U/µL) (Thermo scientific), y se agregó el volumen necesario de agua inyectable para completar la reacción a 10 µL. La reacción se mezcló y centrifugó, para colocarla en el termociclador a las condiciones requeridas (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones para PCR de DENV y ZIKV.

PCR DENV scx/Ts			PCR ZIKV		
Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 minutos	1	95°C	2 minutos
35	94°C	30 segundos	35	95°C	20 segundos
	52.5°C	30 segundos		55°C	20 segundos
	68°C	1:30 segundos		68°C	30 segundos
1	68°C	7 minutos	1	68°C	7 minutos
	4°C	∞		4°C	∞

En el caso de la reacción para DENV, se utilizaron oligonucleótidos para determinar el serocomplejo (SCX), identificados como D1 (oligonucleótido sentido) y D2 (oligonucleótido antisentido) a la concentración de 10 mM, para la determinación del Ts1-4 (Tipo específico) se realizó PCR anidada con la combinación de oligos D1 y Ts1-4 en reacciones separadas (D1-Ts1, D1-Ts2, D1-Ts3 y D1-Ts4) (Lanciotti R S, Calisher C H, Gubler D J, Chang G J, & Vorndam A V, 1992). Por otro lado, la reacción para ZIKV, se utilizaron oligonucleótidos específicos para Zika, identificados como ZIKV F (oligonucleótido sentido) y ZIKV R (oligonucleótido antisentido) diseñados por la Dra. Leticia Cedillo Barrón, Cinvestav IPN, México.

Finalizada la reacción, se tomaron 8 µL y se mezclaron con 1 µL de buffer de carga (Thermo scientific). Se tomó todo el volumen y se cargó en un gel de agarosa (Cleaver scientific Ltd) al 1.5% en TAE 1X, en el equipo de electroforesis Mini Electrophoresis. Se indujo un voltaje de 50 V/ 30 minutos y 75 V/ 15 minutos. Finalmente, se reveló el gel con bromuro de etidio y se observó el tamaño de los amplicones (Tabla 3) en el equipo fotodocumentador GelDoc EZ Imayer (BioRad®).

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición en el genoma	Segmento del genoma	Tamaño del producto (pb)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134-161	Proteína de cápside	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3'	616-644	Proteína de envoltura	
Ts1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGG-3'	565-586	Proteína de envoltura	482
Ts2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	Proteína de envoltura	119
Ts3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	Proteína de envoltura	290
Ts4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	Proteína de envoltura	392
ZIKV F	5'-GCTGGDGCRCACACHGGRAC-3'	1538-1558	Proteína de envoltura	364
ZIKV R	5'-RTCYACYGCCATYTGGRCTG-3'	1883-1902	Proteína de envoltura	

7.7. Inmunofluorescencia

Se evidenció la infección de las células Vero y HFF, por la técnica de inmunofluorescencia, sembrando 8×10^4 células por pozo en un cubreobjetos, para su posterior infección con dos virus referencia: DENV1 WP y ZIKV PR a una multiplicidad de infección (MOI) de 3, así como con dos aislados de pacientes con diagnóstico clínico de las cuales se obtuvieron títulos suficientes para alcanzar la misma MOI. Los virus se incubaron durante 1 hr a 37°C en atmosfera del 5% de CO₂, y posteriormente se agregó medio RPMI al 3% SFB para las células Vero, y al cultivo de HFF se le agregó medio DMEM al 5% SFB, para mantener el periodo de infección durante 2 días a 37°C con atmosfera del 5% de CO₂. Transcurrido el

tiempo, se retiró el medio de cultivo y se fijó la monocapa con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 minutos y se lavó con PBS por duplicado. Posteriormente, la monocapa de células infectadas se incubó con la solución fijadora/permeabilizadora (eBioscience) diluido 1:10 por 30 min/ 4°C en agitación. Una vez permeabilizada las suspensiones de células, se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-E (4G2) desarrollado en ratón, (diluido 1:400 en buffer de lavado) por 1 hr a temperatura ambiente en agitación, y se retiró el exceso con buffer de lavado (PBS 1x, 1% SFB) posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 546 cabra anti-ratón IgG H+L (Invitrogen) diluido 1:200 en buffer de lavado por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Por último, se montaron las laminillas que contenían la monocapa, con 2 µL medio de montaje SlowFade™ Gold Antifade Mountant con DAPI (Invitrogen) en un portaobjetos, para su revisión en el microscopio confocal Leica SP-8.

8. RESULTADOS

De las 14 muestras de pacientes utilizadas, se logró el aislamiento, amplificación y purificación de 2 *Flavivirus*, infectando monocapas celulares de células Vero confluentes con 50µL del aislado viral, mostrando CPE después de 3 días de infección (dpi), el cual se observa como diversas alteraciones en la monocapa celular, células flotando y cambios en la morfología, posiblemente debidos a procesos de muerte celular, este efecto se observa que va aumentando, a medida que transcurre el tiempo, sugiriendo el crecimiento logarítmico de los virus. De igual manera se realizó la preparación del virus referencia DENV1 WP (Figura 11).

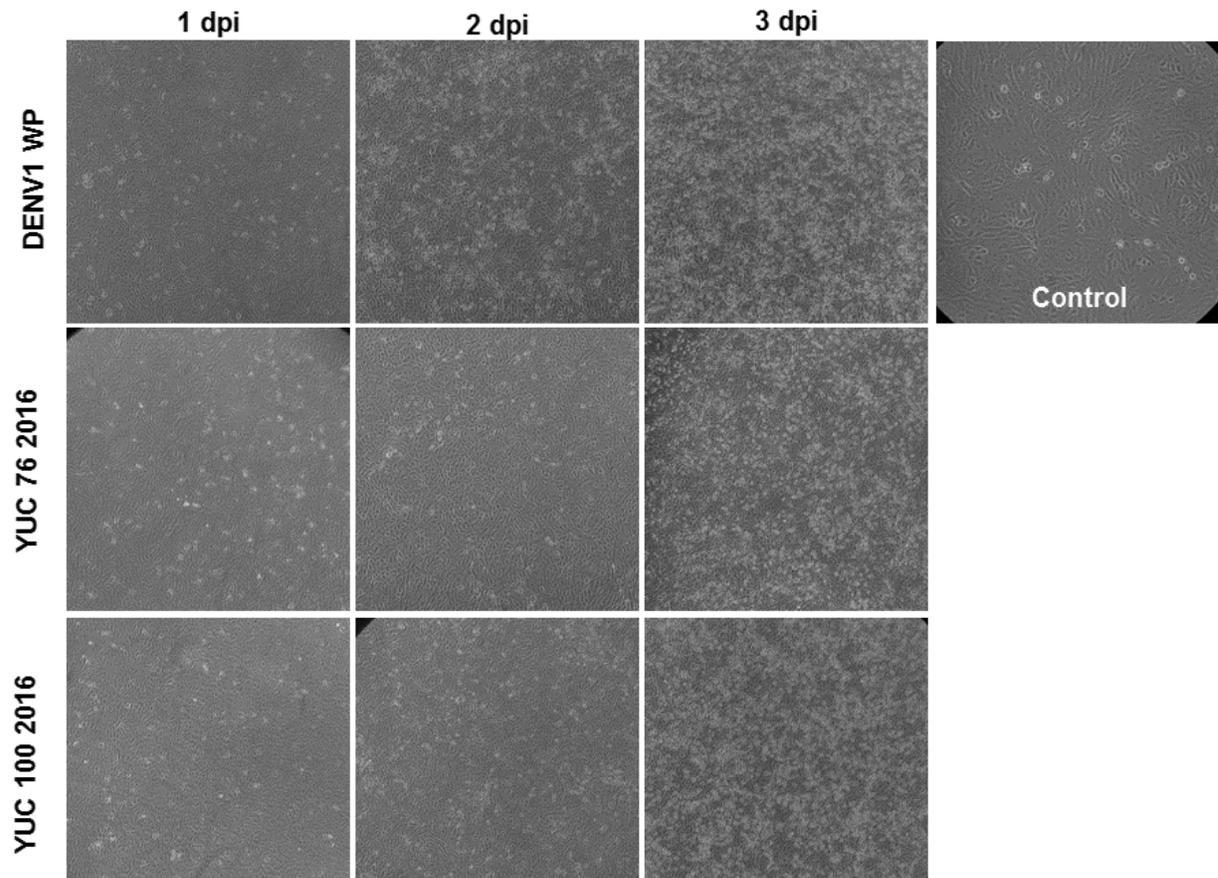


Figura 11. Microscopía óptica de amplificación viral en cultivo celular Vero durante 3dpi. La primera columna corresponde al cultivo celular infectado después de 24 hrs, la segunda columna al cultivo celular infectado después de 48 hrs y la tercera al cultivo celular infectado después de 72 hrs. En la primera fila se encuentra DENV1 WP seguido de las muestras aisladas (YUC 76 y 100 2016). Y en el lado superior derecho, el control sin infección.

Con la finalidad de tipificar la especie de Flavivirus presente en las muestras clínicas, se realizó RT-PCR de las preparaciones purificadas de los virus aislados (YUC 76 2016 y YUC 100 2016). En la Figura 12 se observa que ambos aislados clínicos, amplificaron el tamaño esperado con los oligonucleótidos específicos para DENV y no para los de ZIKV (A), debido a que las bandas observadas en el gel de DENV (B), son producto de la reacción de PCR para amplificar la región flanqueada por los oligonucleótidos específicos para DENV SCX cuyo tamaño molecular es de 511 pb (Tabla 3), mientras que en el caso del gel de ZIKV (A), solo se observa el amplicón esperado en la reacción con el cDNA del control ZIKV PR, cuyo tamaño es de 364 pb (Tabla 3).

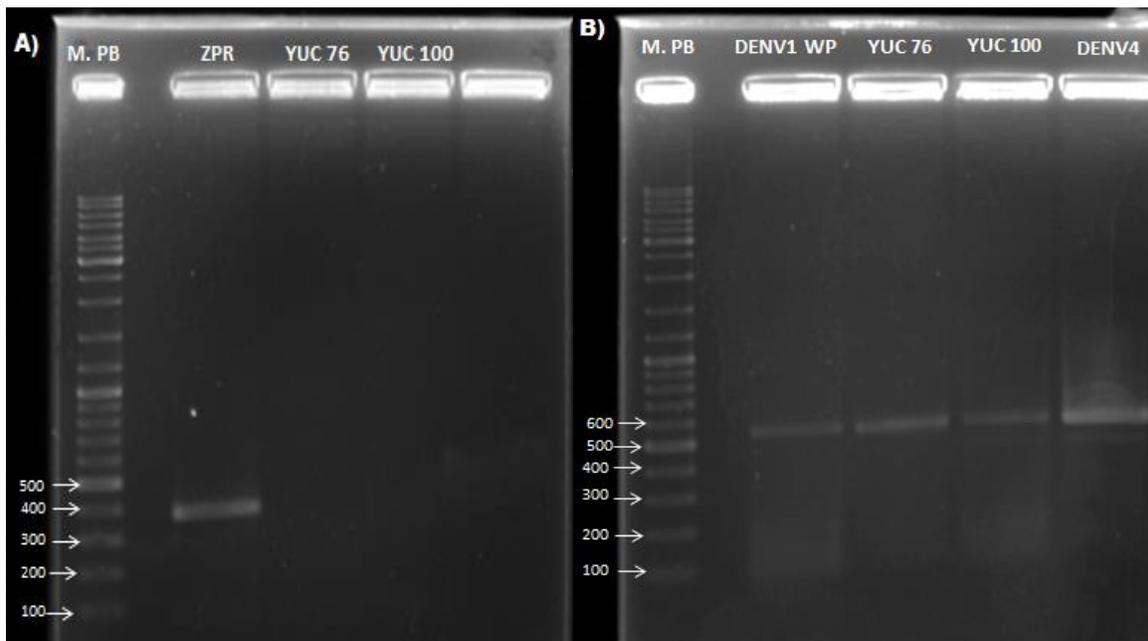


Figura 12. Electroforesis de la tipificación por RT-PCR. A) Gel de PCR para ZIKV, en el primer carril se encuentra el marcador de tamaño molecular en pares de bases (M. PB) y a un costado el tamaño en pb de los fragmentos del marcador. En el segundo carril se resolvió la mezcla de reacción con ZPR como virus referencia y control positivo, con una amplificación entre 300-400 pb y en los carriles siguientes se encuentran las mezclas de reacción con el cDNA de los aislados YUC 76 2016 y YUC 100 2016. **B)** Gel de PCR para DENV, en el primer carril se encuentra el M. PB mostrando a un costado el tamaño de los fragmentos. En el segundo carril se resolvió la mezcla de reacción con DENV1 WP como virus referencia y control positivo, en los siguientes dos carriles, las mezclas de reacción con el cDNA de los aislados YUC 76 2016 y YUC 100 2016 y en el quinto carril DENV4, utilizado como control positivo, mostrando en los carriles del 2-5 el amplicón esperado entre 500-600 pb.

Para evaluar el fenotipo evasor de IFNs-I de los aislados obtenidos, se utilizó como control de ausencia de IFNs-I endógenos la línea celular Vero (células epiteliales), la cual, debido a una delección en el cromosoma 12, es incapaz de producir cualquier tipo de IFN (Desmyter, Melnick, & Rawls, 1968), además, se utilizó la línea celular HFF (fibroblastos humanos), como modelo de presencia de IFNs-I endógenos ya que producen grandes cantidades de IFN- β en respuesta a la presencia de diversos virus RNA (Hiscott, Cantell, & Weissmann, 1984). Se corroboró la susceptibilidad a la infección de los modelos celulares propuestos, por la detección de la proteína E (antígeno viral) de los DENV, tanto en células Vero (Figura 13) como en células HFF (Figura 14) por el análisis en microscopía confocal de fluorescencia. Para ello, se infectaron 8×10^4 células Vero y HFF con DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016, a 3 MOI por separado y se fijaron 48 hrs post-infección, para la tinción indirecta intracelular del antígeno viral (rojo). Se contrasto el núcleo con DAPI (azul).

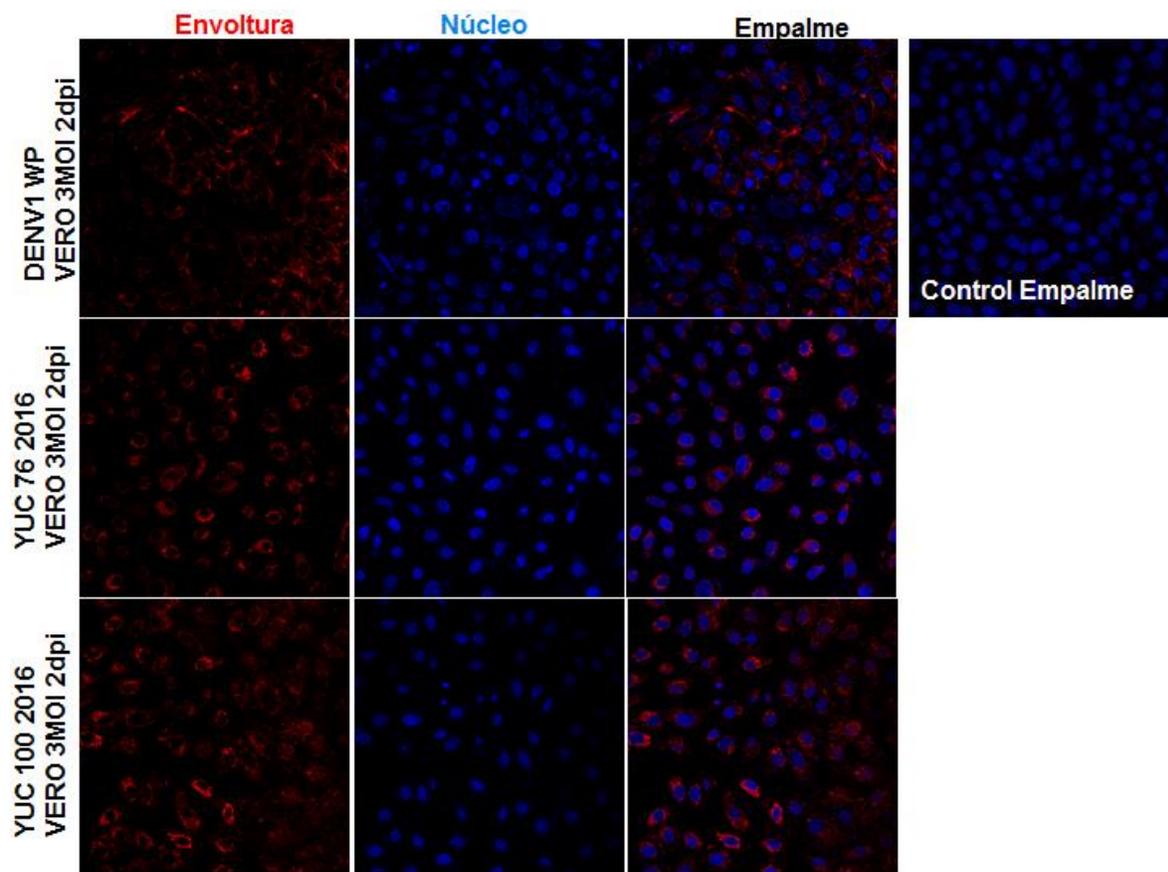


Figura 13. Inmunofluorescencia de antígeno viral en cultivo celular Vero. En la primera columna, se observa fluorescencia del anticuerpo Alexa 536 anti-mouse, unido a él anti-E (4G2). En la columna dos se observa la tinción para núcleo con DAPI, la cual se observa de color azul. La tercera columna es el empalme. En el lateral, se encuentran ubicadas el nombre de las muestras a la que corresponde cada fila, en la primera se observa al virus referencia DENV1 WP, seguido de las muestras de interés (YUC 76 y 100 2016). Y en el lado superior derecho, el control sin infección.

Es evidente la presencia del antígeno viral en el cultivo celular Vero y HFF. Sin embargo, la cantidad de células infectadas el cultivo celular HFF (Figura 14) es menor que en el cultivo celular Vero. De esta manera y en conjunto con la tipificación por RT-PCR, podemos confirmar que los aislados presentes en las muestras YUC 76 2016 y YUC 100 2016 son DENV por la reactividad específica del anticuerpo primario 4G2. Adicionalmente observamos la capacidad infectiva de los aislados clínicos en ambas líneas celulares y finalmente, la resistencia ejercida por el sistema inmunológico innato de las células HFF, ante la infección viral.

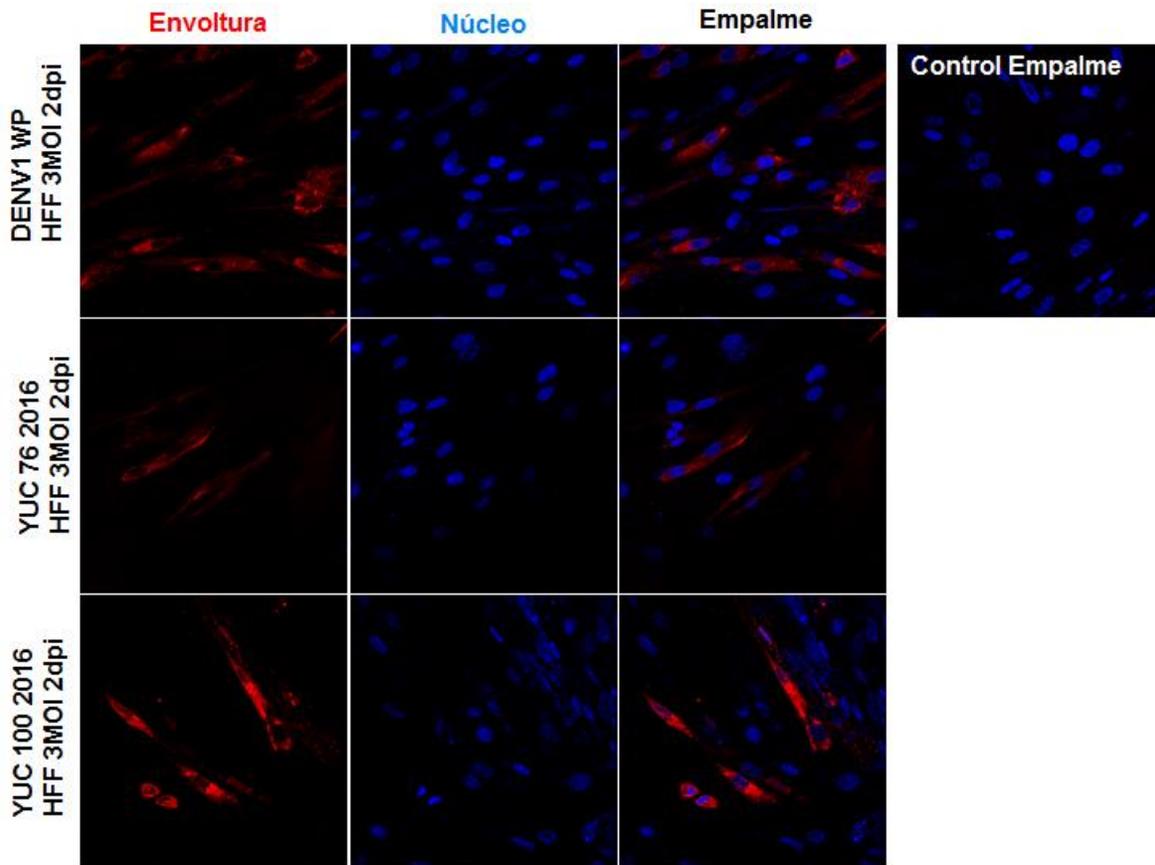


Figura 14. Inmunofluorescencia de antígeno viral en cultivo celular HFF. En la primera columna, se observa fluorescencia del anticuerpo Alexa 536 anti-mouse, unido a él anti-E (4G2). En la columna dos se observa la tinción para núcleo con DAPI, la cual se observa de color azul. La tercera columna es el empalme. En el lateral, se encuentran ubicadas el nombre de las muestras a la que corresponde cada fila, en la primera se observa al virus referencia DENV1 WP, seguido de las muestras de interés (YUC 76 y 100 2016). Y en el lado superior izquierdo, el control sin infección.

La detección del antígeno viral en los cultivos celulares Vero y HFF por microscopía confocal, solo demuestra la capacidad de infección de los aislados, sin embargo, no demuestra si la infección es productiva. Para demostrar cuantitativamente la infección productiva de los aislados clínicos, se realizó una cinética de infección, infectando células Vero y HFF a 0.1 MOI con DENV 1 WP, YUC 76 y YUC 100, se recolectaron sobrenadantes cada 24 hrs por 6 dpi y se cuantificaron las PFUs por inmunocitoquímica (Figura 15, Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4), donde cada placa (puntos azules) está formada por una partícula viral.

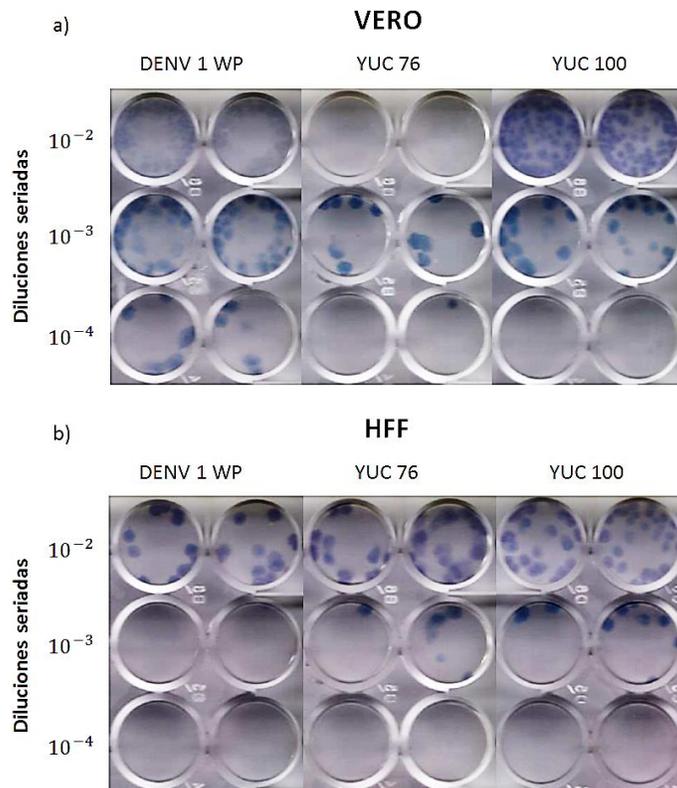


Figura 15. Cuantificación de PFUs por Inmunocitoquímica de *Flavivirus*. a) Morfología de placas generadas por los virus DENV 1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular Vero a 1 dpi. b) Morfología de placas generadas por los virus DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular HFF a 1 dpi.

Se calculó el título viral a partir de los resultados de la cuantificación de PFUs y se construyeron curvas de la cinética de infección de DENV1 WP y los aislados clínicos en ausencia de IFN-I (células VERO) (Figura 16A) y en presencia de IFN-I (células HFF) (Figura 16B). El título viral de los sobrenadantes de las células infectadas (Anexo 5), esta expresado en PFUs/ mL en escala logarítmica con respecto a los dpi. En la línea celular VERO la replicación viral en las muestras YUC 100 2016 y YUC 76 2016 es exponencial, hasta el día tres, posteriormente el título viral disminuye, posiblemente por el CPE en el cultivo celular. En el caso de la línea celular HFF, se observa un comportamiento similar al de la línea celular VERO, pero con diferencia de 1 logaritmo en los títulos alcanzados en cada día.

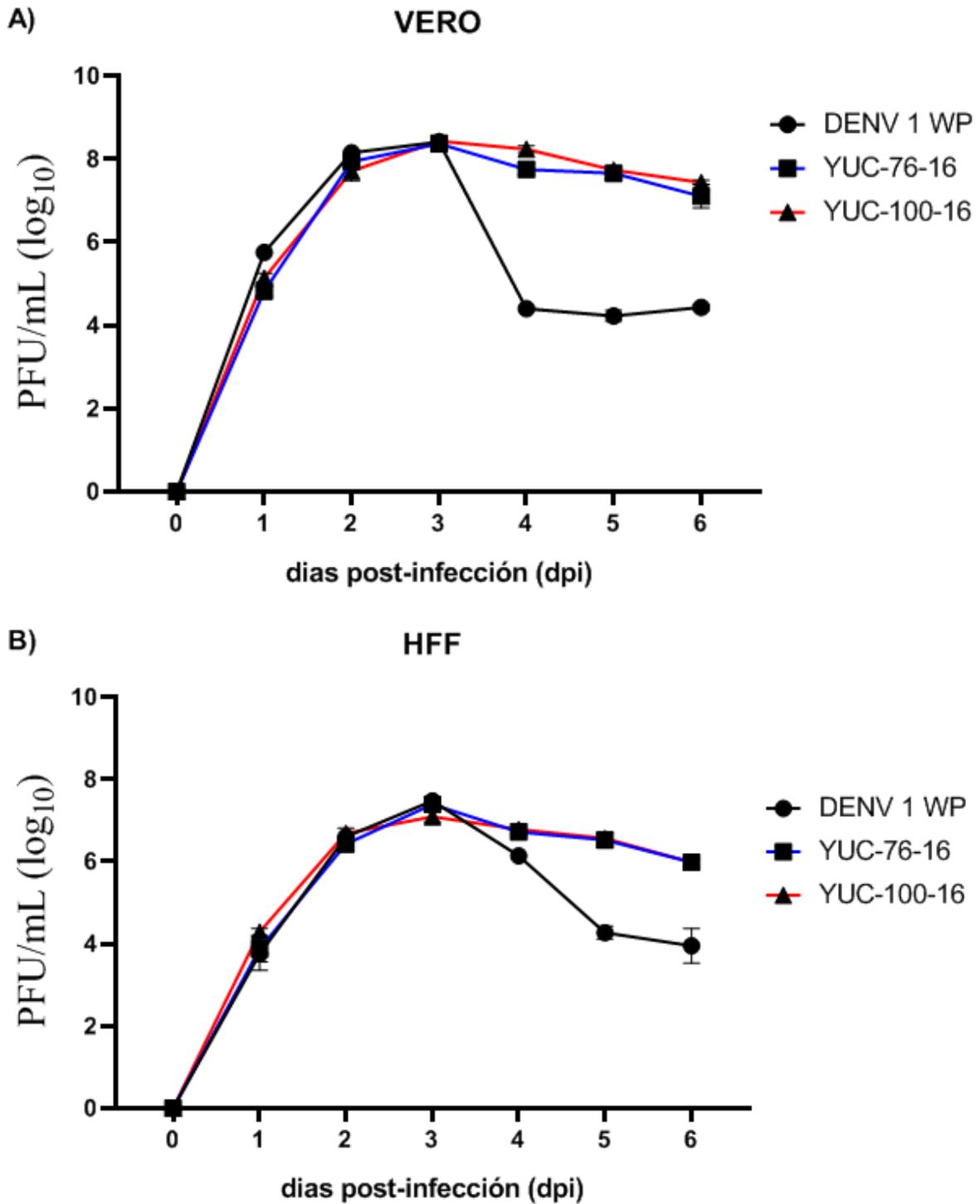


Figura 16. Cinética de infección en células Vero y en células HFF infectadas con DENV1 WP. A) Cinética de infección en células Vero con DENV1WP (círculo negro, línea negra), YUC 76 2016 (cuadrado negro, línea azul) y YUC 100 2016 (triángulo negro, línea roja), durante 6 días. B) Cinética de infección en células HFF con DENV1WP, YUC 76 2016 y YUC 100, durante 6 días.

La evaluación semi-cuantitativa del fenotipo evasor de IFN-I de los aislados clínicos, se presenta en gráficos de barras del porcentaje de reducción de la infección respecto a los dpi (Figura 17). La reducción de la infección se calculó considerando los títulos virales en la línea celular Vero como el 100% y a los títulos virales en la línea celular HFF como el porcentaje de infección en presencia de IFNs-I endógenos:

$$\% \text{ Reducción de la infección} = 100\% - \% \text{ de infección en HFF}$$

Los resultados se analizaron por prueba ANOVA de dos factores y múltiples comparaciones con corrección de Bonferroni. Podemos observar que no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de reducción de la infección entre DENV1 WP y YUC 76 2016 (Figura 17A) durante los 6 días, lo que sugiere que el fenotipo de evasión de IFNs-I de YUC 76 2016 es muy similar al de DENV1 WP. Mientras que en la comparación del porcentaje de reducción en la infección de YUC 100 2016 con a DENV1 WP (Figura 17B) observamos diferencia significativa los días 1, 4 y 5, lo que sugiere que el fenotipo de evasión de IFNs-I de YUC 100 2016, es distinto al de DENV1 WP. Finalmente, no encontramos diferencia estadística significativa del porcentaje ($p < 0.05$) de reducción de la infección entre los aislados YUC 76 2016 y YUC 100 2016, lo que sugiere que la capacidad de evasión de YUC 100 2016, aunque es significativamente menor que la presentada en la infección con DENV1 WP, es cercana en magnitud a la del aislado YUC 76 2016 (Figura 17C).

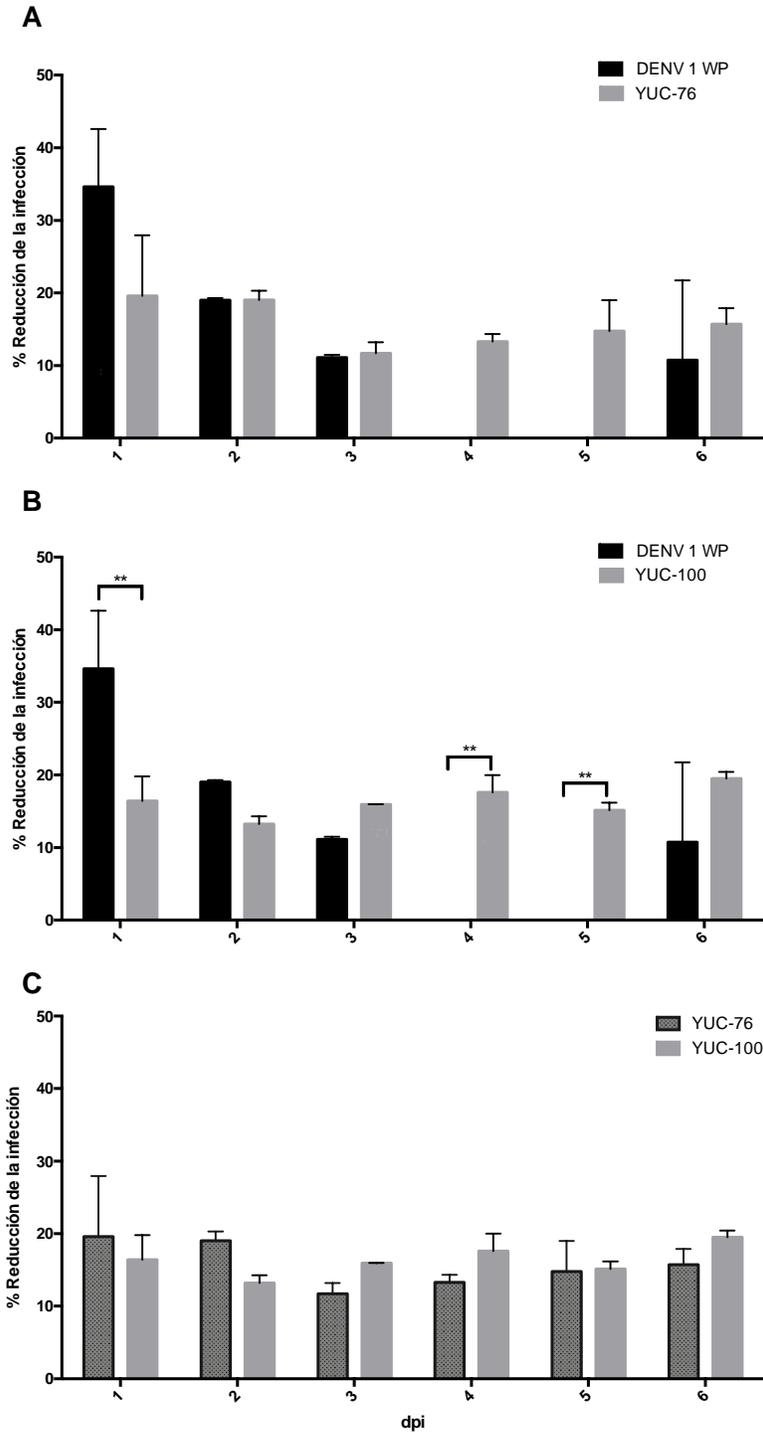


Figura 17. Comparación del porcentaje de reducción de la infección de los aislados de *Flavivirus* (YUC 76 2016 y YUC 100 2016), respecto al virus referencia (DENV1 WP). A) Comparación del porcentaje de reducción de la infección de YUC 76 2016 (Barra gris claro), respecto a DENV1 WP (Barra negra). **B)** Comparación del porcentaje de reducción de la infección de YUC 100 2016 (Barra gris claro), respecto a DENV WP. **C)** Comparación del porcentaje de reducción de la infección de YUC 100 2016 (Barra gris claro), respecto a YUC 76 2016 (Barra gris con patrón negro) Los resultados se compararon por prueba ANOVA de dos factores con corrección de Bonferroni y múltiples comparaciones, usando una α de $P < 0.5$ con intervalo de confianza de 95% en donde $* < 0.05$, $** < 0.005$, $*** < 0.0005$ y $**** < 0.0001$.

9. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

La enfermedad del dengue es causada por la picadura del mosquito hembra hematofaga del género *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Sin embargo, no es el único arbovirus transmitido por dicho vector, ya que se encuentra co-circulando con ZIKV y CHKV (*alphavirus*), lo cual ejerce presión evolutiva por la competencia por el nicho ecológico (Salles et al., 2018). En México durante el 2016 co-circularon los cuatro serotipos de DENV y ZIKV, predominando los casos de DENV (Secretaria de Salud, 2017) (Secretaria de Salud, 2019). En el presente estudio, se utilizaron 14 muestras clínicas de pacientes de diferente sexo y edad, con diagnóstico presuntivo de infección por *Flavivirus* (Tabla 1), donde 11 muestras se reportaron como infección por DENV de acuerdo con los resultados serológicos IgG e IgM anti-DENV, una muestra con resultados serológicos negativos y 2 muestras sin información serológica, pero con signos y síntomas característicos de la enfermedad. De las muestras 076 (YUC 76 2016) y 100 (YUC 100 2016) se logró el aislamiento de *Flavivirus* (Figura 11) identificando el CPE en la monocapa celular. Mientras que del resto de las muestras, no se logró el aislamiento, posiblemente debido a que en su mayoría, las muestras fueron tomadas durante el periodo crítico de la enfermedad, donde la viremia disminuye y hay presencia de IgG e IgM en sangre (Yacoub, Wertheim, Simmons, Screaton, & Wills, 2014), por lo que es posible que la cantidad de virus presentes en estas muestras no fue la suficiente para amplificar al agente etiológico de las manifestaciones clínicas del paciente.

Los aislados YUC 76 2016 y YUC 100 2016 fueron tipificados como DENV (Figura 12), sin embargo, las reacciones de PCR para determinar el serotipo, no dieron resultados positivos (Anexo 1). Posiblemente debido a que dichos oligonucleótidos, se desarrollaron en el año de 1992 con secuencias molde diferentes a secuencias de virus endémicos en México (Lanciotti R S, Calisher C H, Gubler D J, Chang G J, & Vorndam A V, 1992), además, se ha observado que durante el curso de infección de un individuo, el fragmento del genoma que codifica para la proteína E, varía en un 4.1% del resto de la población viral (van Boheemen et al., 2017), por lo que es posible que con el paso de los años, las regiones a las que se unen a los oligonucleótidos ya no sean complementarias (Díaz et al., 2006).

La selección de cuasiespecies, está regulada por la respuesta inmunológica innata, En nuestro modelo de infección en presencia de IFNs-I endógenos observamos que, aunque existe resistencia a la infección viral en células HFF (Figura 14) por la producción de IFN- β (Hiscott, Cantell, & Weissmann, 1984), los aislados clínicos lograron infección productiva (Figura 15B), posiblemente debido a la selección positiva de variantes con mayor capacidad de evasión de la respuesta de IFNs-I (Domingo, Sheldon, & Perales, 2012).

Durante la cinética de infección en células Vero (Figura 16A), los aislados YUC 76 2016 y YUC 100 2016, se comportan de manera similar, posiblemente debido a que ambas muestras fueron aisladas de la misma región geográfica, sometiéndose a la variabilidad climática, co-circulación de serotipos y población genéticamente similar (Torres-Galicia, Cortés-Poza, & Becker, 2014), por lo que las cuasiespecies generadas pudieran ser similares en su capacidad replicativa. Por otro lado, en el caso de DENV1 WP referencia aislado de Naru (Mason, McAda, Mason, & Fournier, 1987), se observa que después de alcanzar el máximo título viral durante la infección al día 3, hay una marcada disminución al día 4, esto puede deberse a la capacidad del virus de activar la muerte celular programada (apoptosis) por la generación de estrés celular y la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno, además de otros tipos de muerte celular, como la necrosis y la piroptosis, causando una disminución en el número de células y por lo tanto la disminución del título viral (Akira et al., 2018) (Valadão, Aguiar, & de Arruda, 2016). El mismo efecto, fue observado en la cinética de infección en células HFF (Figura 16B), sin embargo, se observó mayor resistencia a la infección por los tres aislados, posiblemente por la producción endógena de IFNs-I, ya que estos a su vez, activan cientos de genes estimulados por interferón (ISG's) y cuyos productos protéicos tienen actividad durante el ciclo replicativo viral, ya sea bloqueando la entrada, el desnudamiento, la transcripción, la traducción, el ensamblaje y la salida (Schoggins et al., 2011).

El inicio de la respuesta de IFN-I durante la infección viral se produce desde la entrada del virión, la cual es estimulada por el reconocimiento de los PAMP's virales (Muñoz-Jordan, Sánchez-Burgos, Laurent-Rolle, & García-Sastre, 2003). Esto fue evidente desde 1 dpi, al comparar el porcentaje de reducción de la infección de DENV1 WP respecto al aislado YUC 100 2016 (Figura 17B). Donde el fenotipo evasor de IFN-I del aislado YUC 100 2016 fue mayor, es decir, hubo una menor reducción de la infección y por lo tanto una mayor producción de partículas virales, por lo que es probable, que dicho aislado haya desarrollado mejores estrategias de evasión del sistema inmunológico innato que DENV1 WP, ya que este tuvo una mayor reducción de la infección. Sin embargo, este fenotipo fue revertido a los 4 y 5 dpi. Esto puede deberse a la formación de RNA subgenómico (sfRNA), el cual es producto de la digestión por la exoribonucleasa celular XRN1, sin embargo, esta es detenida en estructuras de pseudonudo en la región 3'-UTR, cuya acumulación, se ha observado que está relacionada en la disminución de la producción de IFN-I (Ooi et al., 2015) (Bustos-Arriaga et al., 2018) y por lo tanto, mejorando la capacidad del virus de completar su ciclo replicativo, aunque no es la única estrategia de los *Flavivirus* para evadir el sistema inmunológico innato.

Para el caso de YUC 76 2016 (Figura 17A), no se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de reducción de la infección con respecto a DENV1 WP. Por lo que ambos aislados virales, tienen un fenotipo de evasión del IFN-I similar.

En conjunto los resultados sugieren la existencia de 3 fenotipos distintos. El primero corresponde al virus referencia DENV1 WP, el cual demostró tener un efecto altamente citopático, comprometiendo así su misma replicación viral, pero no completamente, debido a que después de observarse la disminución en el título viral (Figura 16), también se observó la capacidad de evasión del IFN ya que no hubo porcentaje de reducción de la infección (Figura 17) probablemente mediado por la producción de sRNA de los viriones procesados por las células entre el día 3 y 4 post-infección, lo que ya ha sido reportado en otros estudios (Bustos-Arriaga et al., 2018), posiblemente debido a que el virus ya se adaptó a condiciones de laboratorio. El segundo fenotipo observado, fue el del aislado YUC 76 2016, presentando un fenotipo no citopático, manteniendo títulos virales altos durante toda la cinética de replicación (Figura 16), además de poseer un fenotipo de evasión similar al de DENV1 WP (Figura 17A). Y el tercer fenotipo identificado fue el del aislado YUC 100 2016, que al igual que YUC 76 2016, no presentó efecto citopático, sin embargo, este aislado fue mejor evasor del sistema inmunológico innato durante el día 1 post-infección, pero este fenotipo cambio a partir del día 4 post-infección, observándose mayor susceptibilidad a la respuesta de IFN-I, por lo que es probable, que el efecto observado a 1 dpi se deba a que esté aislado posee mejores estrategias para evitar ser detectado por los PRR's celulares y no necesariamente por el efecto de evasión ISGs.

El fenotipo identificado en los aislados de Yucatán podría estar relacionado con el desarrollo de la enfermedad en los individuos (Tabla 1), el cual fue ambulatorio para ambos sujetos. Debido a que ambos aislados no propiciaron la muerte celular en células epiteliales, ni en fibroblastos humanos, es decir, en un individuo no causan daño tisular y en el caso de dengue, probablemente no generan manifestaciones clínicas como hemorragias. Además, es muy probable que el "fintess" (adaptabilidad) seleccionado en estos aislados tengan, la mayor capacidad de transmisibilidad ya que produjeron entre 10,000,000-100,000,000 partículas virales/mL en 3 dpi, por lo que el mosquito al alimentarse del hospedero podría estar expuesto a una mayor cantidad de viriones completando el ciclo de transmisión (Alonso-Palomares, Moreno-García, Lanz-Mendoza, & Salazar, 2018).

10. CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron 2 virus DENV (YUC 76 2016 y YUC 100 2016), cuyo fenotipo de evasión del IFN-I, fue completamente distinto. Donde ambos aislados no presentan efectos citopáticos durante la infección y por lo tanto se observaron títulos virales superiores a los de DENV1 WP. Sin embargo, respecto al fenotipo evasor, se observó que YUC 100 2016 fue mejor evasor del sistema inmunológico innato durante el primer día de infección, pero este fenotipo se revirtió, con respecto a DENV1 WP y YUC 76 2016, por lo que es probable que YUC 76 2016 prevalezca en la población mexicana de Yucatán, debido a que es capaz de evadir mejor el sistema inmunológico, sin causar signos y síntomas graves. Además, su transmisibilidad podría ser mayor, ya que el vector al alimentarse del hospedero podría exponerse a una alta cantidad de partículas virales infecciosas.

El conjunto de los resultados obtenidos, demuestran que el modelo semi-cuantitativo propuesto, permite identificar el fenotipo evasor de IFN-I. Sin embargo, este fenotipo se ve afectado por: factores ambientales, el vector, el fondo genético de la población y la capacidad de adaptación (*fitness*) de los *Flavivirus*, se requieren más experimentos para caracterizar las estrategias de inducción de muerte celular, así como los mecanismos de evasión de IFN-I por parte de los aislados

11. PERSPECTIVAS

Se comprobó la variabilidad del fenotipo evasor de IFN-I, por un método semi-cuantitativo, por lo que se recomienda realizar estudios cuantitativos, para observar la capacidad máxima de evasión del IFN-I de los virus aislados en curvas concentración/respuesta. Además, de comprobar la existencia de cuasiespecies, mediante la secuenciación de los aislados y estudiar cuales son los elementos en la secuencia que proporcionan la capacidad a los *Flavivirus* de evadir el sistema inmunológico innato. También se propone extender este tipo de estudios con muestras de otros estados de la República Mexicana ya que, como se observó, a pesar de ser aislados de la misma región geográfica, el fenotipo no es exactamente el mismo.

12. REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A, (2015) *Inmunología celular y molecular* (8th ed.). Elsevier, España, 563p.
- Akira, S., Huang, D. C. S., Fukuhara, T., Tokunaga, M., Matsuura, Y., Satoh, T., ... Sugiyama, Y. (2018). Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival. *PLOS Pathogens*, 14(9), e1007299. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007299>
- Alonso-Palomares, L. A., Moreno-García, M., Lanz-Mendoza, H., & Salazar, M. I. (2018). Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Intervirology*, 61(6), 255–264. <https://doi.org/10.1159/000499128>
- Arredondo-García, J., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Acta pediátrica de México : APM. In *Acta pediátrica de México* (Vol. 37). Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111
- Bandurska, K., Król, I., & Myga-Nowak, M. (2014). Interferons: between structure and function. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 68, 428–440. <https://doi.org/10.5604/17322693.1101229>
- Beltrán-Silva, S. L., Chacón-Hernández, S. S., Moreno-Palacios, E., & Pereyra-Molina, J. Á. (2018). Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 81(3), 146–153. <https://doi.org/10.1016/J.HGMX.2016.09.011>
- Bradrick, S. S. (2017). Causes and Consequences of Flavivirus RNA Methylation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02374>
- Bidet, K., Dadlani, D., & Garcia-Blanco, M. A. (2014). G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004242>
- Bustos-Arriaga, J., Gromowski, G. D., Tsetsarkin, K. A., Firestone, C.-Y., Castro-Jiménez, T., Pletnev, A. G., ... Whitehead, S. S. (2018). Decreased accumulation of subgenomic RNA in human cells infected with vaccine candidate DEN4Δ30 increases viral susceptibility to type I interferon. *Vaccine*, 36(24), 3460–3467. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.087>
- Campos, J. L. S., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2018). The immune response against flaviviruses. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>Castillo Ramirez, J. A., & Urcuqui-Inchima, S. (2015). Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 35(6), 421–430. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0129>

- Cao, B., Diamond, M. S., & Mysorekar, I. U. (2017). Maternal-Fetal Transmission of Zika Virus: Routes and Signals for Infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 37(7), 287. <https://doi.org/10.1089/JIR.2017.0011>
- CDC. (2017). Virus Zika. [versión electrónica] Recuperado el 2 de septiembre de 2018 de: <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/preparing-for-zika/clinicalevaluationdisease.html>.
- CDC. (2019). Dengue. [versión electrónica]. Recuperado el 2 de septiembre de 2018 de: <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/clinical.html>.
- Cedillo-Barrón, L., García-Cordero, J., Shrivastava, G., Carrillo-Halfon, S., León-Juárez, M., Bustos Arriaga, J., ... Gutiérrez Castañeda, B. (2018). The role of flaviviral proteins in the induction of innate immunity. In *Subcellular Biochemistry* (Vol. 88). https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_17
- Chen, Y.-C., Wang, S.-Y., & King, C.-C. (1999). Bacterial Lipopolysaccharide Inhibits Dengue Virus Infection of Primary Human Monocytes/Macrophages by Blockade of Virus Entry via a CD14-Dependent Mechanism. *Journal of Virology*, 73(4), 2650. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104020/>
- Dantés, H. G., Farfán-Ale, J. A., & Sarti, E. (2014). Epidemiological Trends of Dengue Disease in Mexico (2000–2011): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), e3158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003158>
- Díaz, F. J., Black IV, W. C., Farfán-Ale, J. A., Loroño-Pino, M. A., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2006). Dengue Virus Circulation and Evolution in Mexico: A Phylogenetic Perspective. *Archives of Medical Research*, 37(6), 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.02.004>
- Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 76(2), 159–216. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>
- García-Ramírez, R. A., Ramírez-Venegas, A., Quintana-Carrillo, R., Camarena, A. E., Falfán-Valencia, R., & Mejía-Aranguré, J. M. (2015). TNF, IL6, and IL1B polymorphisms are associated with severe influenza a (H1N1) virus infection in the Mexican Population. *PLoS ONE*, 10(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144832>
- Galanter, J. M., Hidalgo-Miranda, A., Bustamante, C. D., Garcia-Herrera, R., Acuna-Alonzo, V., Ford, J. G., ... Robles, V. (2014). The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*, 344(6189), 1280–1285. <https://doi.org/10.1126/science.1251688>
- Griesemer, S. B., Kramer, L. D., Van Slyke, G. A., Pata, J. D., Gohara, D. W., Cameron, C. E., & Ciota, A. T. (2017). Mutagen resistance and mutation restriction of St. Louis encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 98(2), 201–211. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000682>.

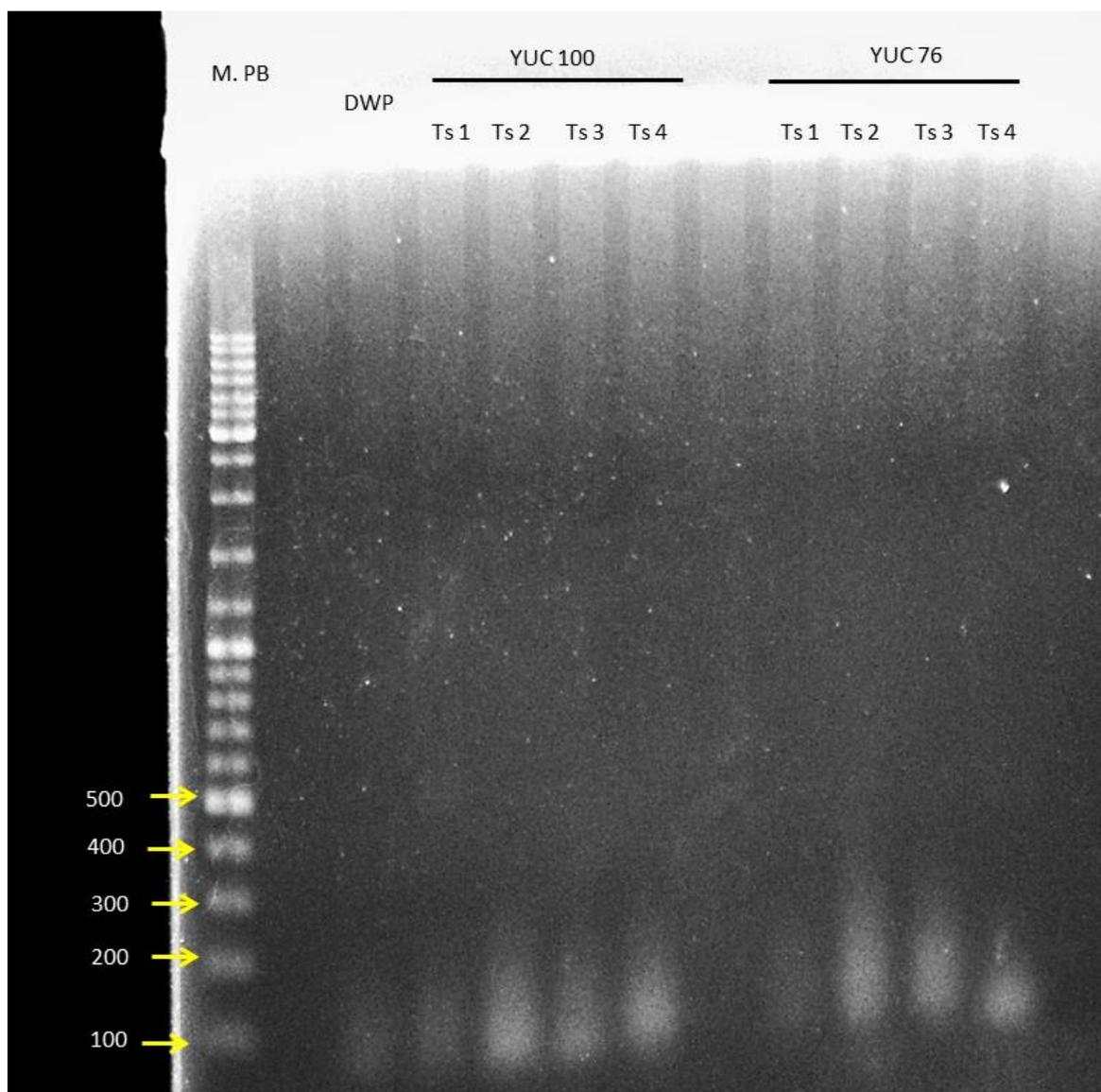
- Higa, Y. (2011). Dengue Vectors and their Spatial Distribution. *Tropical Medicine and Health*, 39(4 Suppl), 17–27. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S04>.
- Hiscott, J., Cantell, K., & Weissmann, C. (1984). Differential expression of human interferon genes. *Nucleic Acids Research*, 12(15), 20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1405>
- Gong, Z., Gao, Y., & Han, G.-Z. (2016). Zika Virus: Two or Three Lineages? *Trends in Microbiology*, 24(7), 521–522. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.002>
- Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., & Smith, D. R. (2004). Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Archives of Virology*, 149(5), 915–927. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0263-x>
- Klema, V. J., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2015). Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*, 7(8), 4640–4656. <https://doi.org/10.3390/v7082837>
- Klotz, D., & Gerhauser, I. (2019). Interferon-Stimulated Genes-Mediators of the Innate Immune Response during Canine Distemper Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071620>
- Kollmann, T. R. (2013). Variation between populations in the innate immune response to vaccine adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00081>
- Kurscheidt, F. A., Mesquita, C. S. S., Damke, G. M. Z. F., Damke, E., Carvalho, A. R. B. de A., Suehiro, T. T., ... Consolaro, M. E. L. (2019). Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nature Reviews Urology*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0149-7>
- Lanciotti R S, Calisher C H, Gubler D J, Chang G J, & Vorndam A V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), 545–551.
- Luo, D., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Research*, 118, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>
- Malterer, M. B., Glass, S. J., & Newman, J. P. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 44(3), 735–745. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Mason, P. W., McAda, P. C., Mason, T. L., & Fournier, M. J. (1987). Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology*, 161(1), 262–267. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90196-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90196-6)

- Mazeaud, C., Freppel, W., & Chatel-Chaix, L. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Frontiers in Genetics*, 9, 595. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00595>
- McLean, J. E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., & Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22147–22159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192500>
- Miorin, L., Maestre, A. M., Fernandez-Sesma, A., & García-Sastre, A. (2017). Antagonism of type I interferon by flaviviruses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.146>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Muñoz-Jordan, J. L., Sánchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., & García-Sastre, A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14333–14338. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., ... Desprès, P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Reports*, 4(7), 723–728. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor866>
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 125–142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
- Ooi, E. E., Ong, E. Z., Gunaratne, J., Garcia-Blanco, M. A., Bahl, J., Tan, H. C., ... Finol, E. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, 350(6257), 217–222. <https://doi.org/10.1126/science.aab3369>
- Pan American Health Organization / World Health Organization. (2019). *Actualización Epidemiológica: Dengue*. Recuperado de www.paho.org
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., Espinosa, D. A., Biering, S. B., Patana, M., Ratnasiri, K., ... Harris, E. (2019). Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Reports*, 26(6), 1598-1613.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.036>
- Rey, F. A., Stiasny, K., Vaney, M.-C., Dellarole, M., & Heinz, F. X. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Reports*, 19(2), 206–224. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>

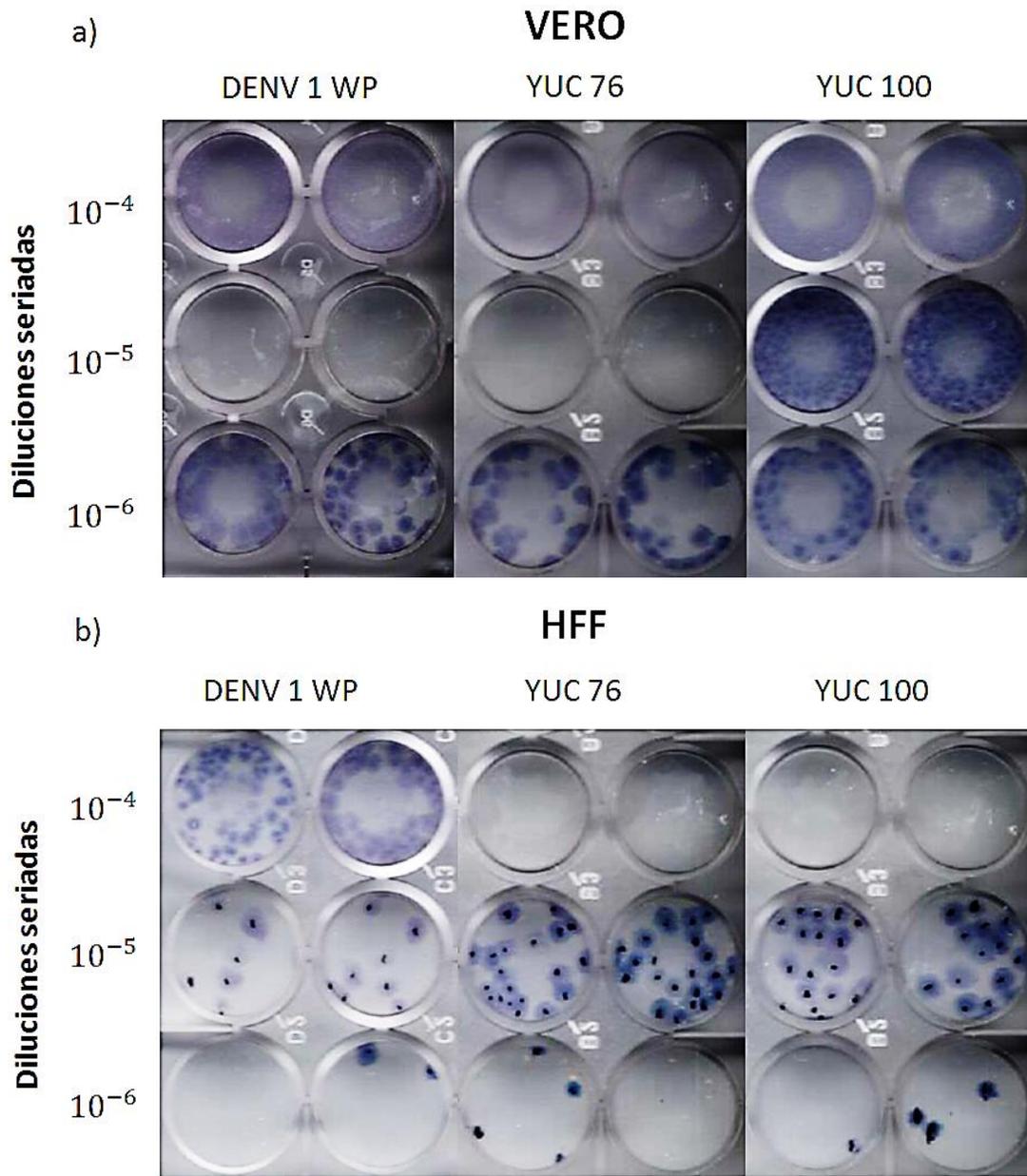
- Reynolds, M. J., Durbin, A. P., Chanock, R. M., Whitehead, S. S., Murphy, B. R., Elkins, W. R., ... Perreault, J. R. (2001). Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 405–413. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.405>
- Salles, T. S., da Encarnação Sá-Guimarães, T., de Alvarenga, E. S. L., Guimarães-Ribeiro, V., de Meneses, M. D. F., de Castro-Salles, P. F., ... Moreira, M. F. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasites & Vectors*, 11(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2830-8>
- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P., & Rice, C. M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, 472(7344), 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature09907>
- Secretaria de Salud. (2020). Infección por virus Zika. Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/infeccion-por-virus-zika-21776>.
- Secretaria de Salud (2020). Casos confirmados de Enfermedad por Virus Zika". Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/468162/Cuadro_Casos_ZIKA_y_Emb_SE22_2019.pdf
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The cryo-em structure of zika virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95 (5 Supp(6284), 571. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.abstract2016>
- Suthar MS, Aguirre S, Fernandez-Sesma A (2013) Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *PLoS Pathog* 9(9): e1003541. doi:10.1371/journal.ppat.1003541
- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., & Becker, I. (2014). Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 71(4), 196–201. <https://doi.org/10.1016/J.BMHIMX.2014.08.003>
- Valadão, A. L. C., Aguiar, R. S., & de Arruda, L. B. (2016). Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01233>
- van Boheemen, S., Tas, A., Anvar, S. Y., van Grootveld, R., Albulescu, I. C., Bauer, M. P., ... van Hemert, M. J. (2017). Quasispecies composition and evolution of a typical Zika virus clinical isolate from Suriname. *Scientific Reports*, 7(1), 2368. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02652-w>
- Wu, R.-H., Tsai, M.-H., Tsai, K.-N., Tian, J. N., Wu, J.-S., Wu, S.-Y., ... Yueh, A. (2017). Mutagenesis of Dengue Virus Protein NS2A Revealed a Novel Domain Responsible for Virus-Induced Cytopathic Effect and Interactions between NS2A and NS2B Transmembrane Segments. *Journal of Virology*, 91(12). <https://doi.org/10.1128/JVI.01836-16>

- Yacoub, S., Wertheim, H., Simmons, C. P., Srean, G., & Wills, B. (2014). Cardiovascular manifestations of the emerging dengue pandemic. *Nature Reviews Cardiology*, 11(6), 335–345. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.40>
- Yun, S.-I., Song, B.-H., Frank, J. C., Julander, J. G., Polejaeva, I. A., Davies, C. J., ... Lee, Y.-M. (2016). Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome Announcements*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00800-16>
- WHO. (2016). Síndrome de Guillain-Barré. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/guillain-barr%C3%A9-syndrome>
- WHO. (2019). Dengue y dengue grave. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

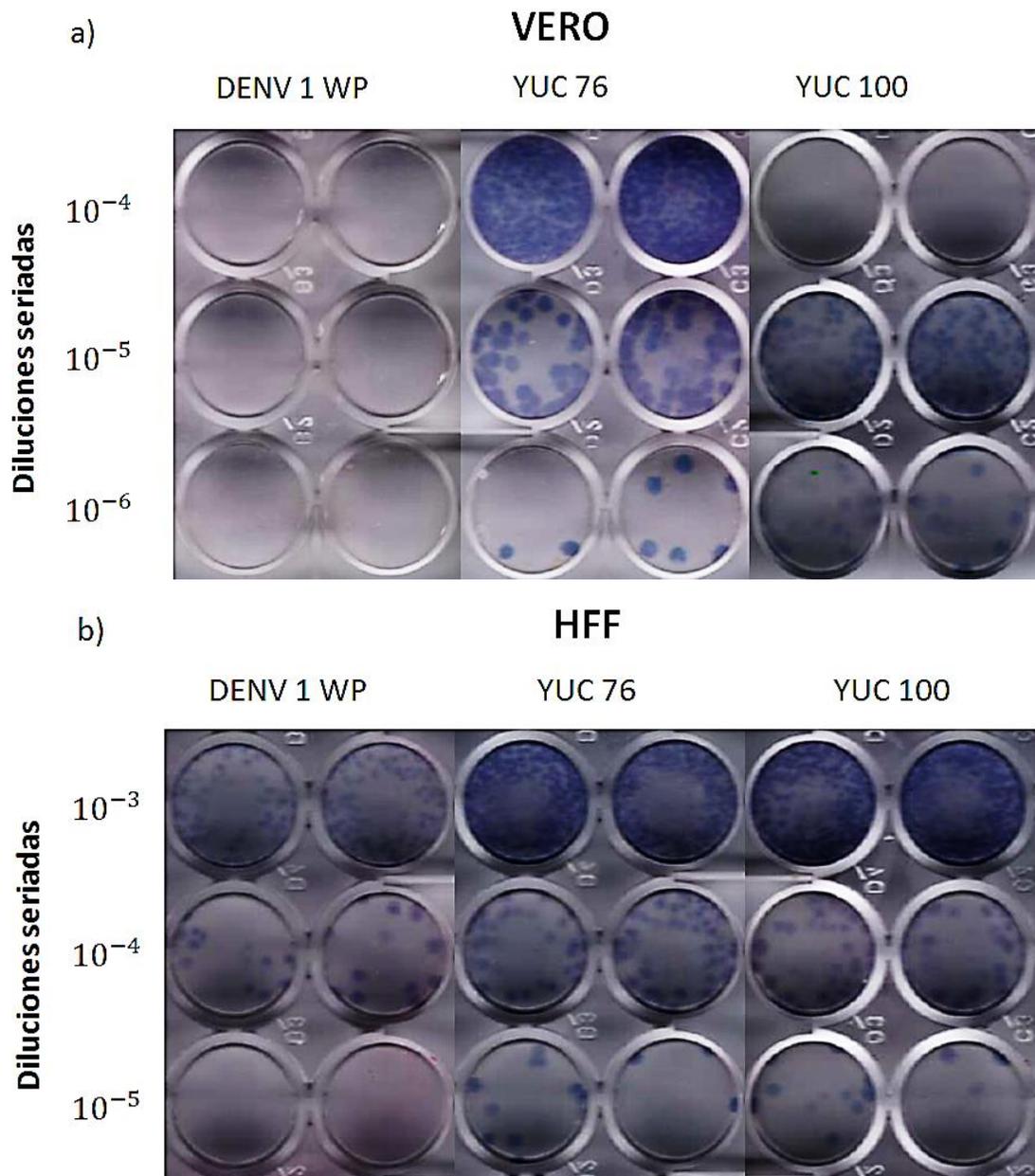
ANEXOS



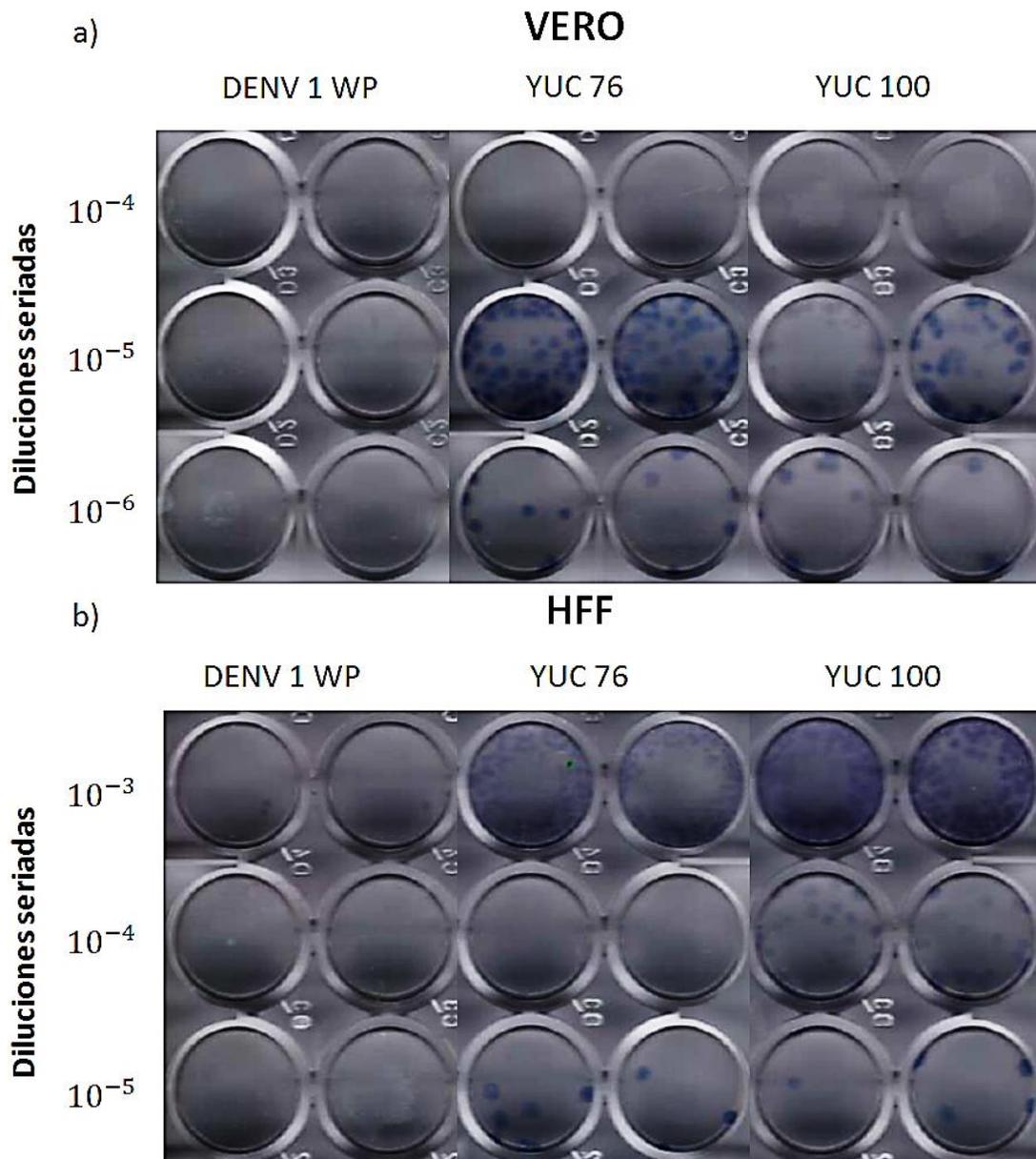
Anexo 1. Electroforesis del gel de PCR para de las muestras YUC 100 2016 y YUC 76 2016 utilizando oligonucleótidos para determinar el serotipo (Ts) y utilizando DENV1 WP como control.



Anexo 2. Inmunocitoquímica anti-E de *Flavivirus* cosechados a 3 dpi. a) Morfología de placas generadas por los virus DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular Vero. b) Morfología de placas generadas por los virus DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular HFF.



Anexo 3. Inmunocitoquímica anti-E de *Flavivirus* cosechados a 4 dpi. a) Morfología de placas generadas por los virus DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular Vero. b) Morfología de placas generadas por los virus DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular HFF.



Anexo 4. Inmunocitoquímica anti-E de *Flavivirus* cosechados a 5 dpi. a) Morfología de placas generadas por los virus DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular Vero. b) Morfología de placas generadas por los virus DENV1 WP, YUC 76 2016 y YUC 100 2016 cosechadas de la línea celular HFF.

Anexo 5. Tabla de títulos virales

Línea celular VERO

<i>dpi</i>	DENV 1 WP		YUC-76-16		YUC-100-16	
	PFU/mL (log)	PFU/mL	PFU/mL (log)	PFU/ml	PFU/mL (log)	PFU/mL
1	5.75	562,341.33	4.82	66,069.34	5.13	134,896.29
2	8.15	141,253,754.5	7.94	87,096,359	7.70	50,118,723.36
3	8.40	251,188,643.2	8.36	229,086,765.3	8.43	296,153,480.4
4	4.4	25,118.86	7.74	54,954,087.39	8.23	169,824,365.2
5	4.23	16,982.44	7.65	44,668,359.22	7.73	53,703,179.64
6	4.43	26,915.35	7.1	12,589,253.12	7.43	26,915,348.04

Línea celular HFF

<i>dpi</i>	DENV 1 WP		YUC-76-16		YUC-100-16	
	PFU/mL (log)	PFU/mL	PFU/mL (log)	PFU/mL	PFU/mL (log)	PFU/mL
1	3.75	5,623.41	3.87	7,413.1	4.29	19,498.45
2	6.60	3,981,071.71	6.42	2,630,267.99	6.68	4,786,300.92
3	7.47	29,512,092.27	7.38	239,883,329.2	7.08	12,022,644.35
4	6.13	1,348,962.88	6.71	5,128,613.84	6.78	6,025,595.86
5	4.27	18,620.87	6.52	3,311,311.21	6.56	3,630,780.55
6	3.95	8,912.51	5.98	954,992.59	5.98	954,992.59