



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Estudio de la interacción del virus de Zika con
proteínas de membrana celular”**

Tesis para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Químicas
Área de Bioquímica y Biología Molecular**

Presenta:

I.B.T. Keren Areli Lozada Lay

Directores de tesis:

D. en C. Lourdes Millán Pérez Peña

D. en C. Gerardo Santos López



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Nidia Gary Pazos Salazar, Dr. Julio Reyes Leyva, Dra. Irma Herrera Camacho y la Dra. Virginia Sedeño Monge, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada “**Estudio de la interacción del virus de Zika con proteínas de membrana celular**”, que presenta la alumna **Keren Areli Lozada Lay** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintidós días del mes de noviembre del año dos mil diecinueve.

ATENTAMENTE

Dra. Nidia Gary Pazos Salazar

Dr. Julio Reyes Leyva

Dra. Irma Herrera Camacho

Dra. Virginia Sedeño Monge

Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCQ 10,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397
posgrado.quimica@correo.buap.mx

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología Médica del Centro de Investigación Biomédica de Oriente en el Hospital General de Zona No. 5 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Como alumna de posgrado recibí beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 785046 (2017-2018) y del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de matrícula 97220049 (2017-2019).

INDICE

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES	- 3 -
I. LISTA DE FIGURAS	- 6 -
II. LISTA DE TABLAS	- 8 -
RESUMEN	- 9 -
1. INTRODUCCIÓN	- 10 -
1.1 Epidemiología	- 11 -
1.2 Transmisión	- 13 -
1.2.1 Transmisión sexual	- 14 -
1.2.2 Transmisión secundaria	- 16 -
1.2.3 Transmisión intrauterina	- 18 -
1.3 Manifestaciones clínicas de la infección por el virus de Zika	- 19 -
1.3.1 Complicaciones clínicas durante la infección por el virus de Zika	- 20 -
1.4 Genoma del virus de Zika	- 23 -
1.4.1 Proteínas estructurales y no estructurales del virus de Zika	- 24 -
1.4.2 Replicación del virus de Zika	- 26 -
1.5 Interacciones entre el virus de Zika y la célula hospedera	- 29 -
2 ANTECEDENTES	- 33 -
2.1 Receptores celulares en la entrada del virus de Zika	- 33 -
2.2 Receptores TIM	- 34 -
2.3 Receptores TAM	- 37 -
2.3 Incorporación de la fosfatidilserina en la envoltura de los flavivirus y su interacción con los receptores TIM Y TAM	- 41 -
3. JUSTIFICACIÓN	- 46 -
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 47 -
5. HIPÓTESIS	- 48 -
6. OBJETIVOS	- 48 -
6.1 Objetivo general	- 48 -
6.2 Objetivos específicos	- 48 -
7. METODOLOGÍA	- 49 -
7.1 Cultivo celular	- 49 -
7.1.1 Células C6/36	- 49 -
7.1.2 Células BHK-21	- 49 -
7.2 Propagación del virus de Zika	- 49 -
7.3 Titulación del virus de Zika	- 50 -

7.4 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular BHK-21	- 50 -
7.5 Identificación de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3 en la línea celular BHK-21-51 -	
7.6 Bloqueo de los receptores en la línea celular BHK-21	- 52 -
8 RESULTADOS	- 54 -
8.1 Replicación del virus de Zika	- 54 -
8.2 Titulación del virus de Zika	- 55 -
8.3 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular BHK-21	- 56 -
8.4 Identificación de los receptores en la línea celular BHK-21	- 57 -
8.5 Bloqueo de los probables receptores para el virus de Zika en la línea celular BHK-21	- 60 -
9. DISCUSIÓN	- 69 -
10. CONCLUSIONES	- 74 -
11. REFERENCIAS	- 75 -

I. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Transmisión del virus de Zika.

Figura 2. Países que reportaron transmisión sexual del virus de Zika del año 2011 al año 2016.

Figura 3. Vías utilizadas por los patógenos TORCH para traspasar la barrera placentaria.

Figura 4. Complicaciones clínicas causadas por el virus de Zika.

Figura 5. Estructura y organización del genoma del virus de Zika.

Figura 6. Replicación de los flavivirus.

Figura 7. Estructura de las proteínas de inmunoglobulina y dominio de mucina (TIM) de células T humanas.

Figura 8. Modelo para la absorción del virus mediada por fosfatidilserina.

Figura 9. Receptores y ligandos TAM.

Figura 10. Adquisición de la fosfatidilserina en el Retículo Endoplásmico.

Figura 11. Posible mecanismo de exposición de la fosfatidilserina en los viriones de los flavivirus.

Figura 12. Adquisición de la fosfatidilserina en las partículas virales de los flavivirus y la mejora mediada por el receptor TIM y TAM de infección por flavivirus.

Figura 13. Propagación del virus de Zika en la línea celular C6/36.

Figura 14. Replicación del virus de Zika en la línea celular BHK-21.

Figura 15. Titulación del virus de Zika en la línea celular BHK-21.

Figura 16. Titulación del virus de Zika en la línea celular BHK-21.

Figura 17. Identificación del virus de Zika.

Figura 18. Identificación de las proteínas TAM y TIM.

Figura 19. Identificación de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 durante la infección con el virus de Zika.

Figura 20. Identificación de las proteínas TIM-1, Axl y Tyro-3 en células infectadas con el virus de Zika.

Figura 21. Bloqueo de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 y su efecto en la infección del virus de Zika a MOI de 0.1.

Figura 22. Bloqueo de las proteínas Ax1, TIM-1 y Tyro-3 en células infectadas con el virus de Zika a MOI de 1.

Figura 23. Bloqueo de dos o tres receptores en células infectadas con el virus de Zika a MOI de 0.1 de manera simultánea.

Figura 24. Bloqueo de dos o tres receptores en células infectadas con el virus de Zika a MOI de 1.

II. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Detección del ARN del virus de Zika de diferentes tipos de muestras.

Tabla 2. Líneas celulares permisivas y para la propagación del virus de Zika.

Tabla 3. Infección del virus de Zika en células tratadas con anticuerpos anti-Axl, anti-TIM-1 y anti-Tyro-3.

Tabla 4. Bloqueo de dos o tres receptores en células BHK-21 infectadas con el virus de Zika.

RESUMEN

La infección por el virus de Zika causa una enfermedad no grave caracterizada por síntomas como fiebre, artritis, artralgia, erupción cutánea y conjuntivitis leve; sin embargo, en infecciones recientes fue asociado con problemas importantes tales como microcefalia en bebés de madres infectadas y con el síndrome de Guillain-Barré, por lo que es necesario estudiar su capacidad y su mecanismo de infección. El objetivo principal del proyecto fue determinar la interacción del virus de Zika con proteínas de membrana celular, por lo que se determinó la permisividad de la línea celular BHK-21, que fue nuestro modelo de estudio en este proyecto, a la infección por el virus de Zika; también se determinó la presencia de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro en las células y por último se determinó si estas proteínas estaban involucradas como principales receptores para la entrada del virus de Zika en las células BHK-21. En este trabajo se identificaron las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 mediante anticuerpos específicos y marcje con fluorescencia en células susceptibles a la infección por el virus de Zika en las células BHK-21 para evaluar el bloqueo de los posibles receptores para la entrada del virus de Zika ; también se realizó la incubación con anticuerpos específicos para cada uno de las proteínas previamente a la infección con el virus de Zika para evaluar el bloqueo de los posibles receptores para la entrada del virus. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia acoplado a un sistema de reconstrucción 3D. Nuestros resultados confirman la presencia de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3, sin embargo, cuando las células son infectadas a diferentes dosis virales, la señal de las proteínas TIM-1 y Tyro-3 se ve incrementada en comparación con las células infectadas pero la señal de la proteína Axl no muestra diferencias significativas entre las células infectadas y las células no infectadas, lo que nos permitió concluir que la proteína TIM-1, mayoritariamente, y Tyro-3 son estimulados por la infección causada por el virus de Zika en las células BHK-21. Por otra parte, la incubación con anticuerpos específicos contra las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 previamente a la infección viral, ya sea específicamente para un solo anticuerpo o bien en combinación de los anticuerpos, se observó una disminución de la infección del virus de Zika en las células BHK-21, esta disminución se observó mayoritariamente en presencia de los anticuerpos de Axl y TIM-1, por lo que nos lleva a la conclusión de que la entrada del virus está mediada principalmente por el receptor Axl pero con participación del receptor TIM-1, el cual podría estar llevando la interacción entre el virión y la célula blanco para posteriormente facilitar su entrada con el receptor Axl. Sin embargo, en ningún caso, el bloqueo de las proteínas por medio de anticuerpos eliminó la infección de manera completa, por lo que es posible que haya más moléculas que podrían funcionar como receptores para el virus, además de las tres proteínas de superficie estudiadas en este proyecto.

1. INTRODUCCIÓN

La fiebre del Zika es una enfermedad viral transmitida principalmente por mosquitos y es causada por el virus de Zika. El cuadro clínico de la fiebre por Zika es inespecífico y puede diagnosticarse erróneamente como otras enfermedades infecciosas, especialmente las causadas por arbovirus como el dengue y el chikungunya, sin embargo, consiste en fiebre leve, sarpullido (principalmente maculopapular), dolor de cabeza, dolor en las articulaciones, dolor muscular, malestar general y conjuntivitis no purulenta que ocurre entre dos a siete días después de la picadura del mosquito vector. Una de cada cuatro personas desarrolla síntomas, los cuales generalmente son leves, y con una duración de dos a siete días ¹.

El virus de Zika es un virus transmitido por artrópodos (arbovirus) del género *Flavivirus* y la familia *Flaviviridae*. El virus se aisló por primera vez en un primate no humano en el año de 1947 y en mosquitos en el año de 1948 en África ². El virus de Zika se transmite en humanos principalmente por la picadura de los mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El virus de Zika ha sido detectado durante décadas en África y Asia, pero en el año 2007, se extendió principalmente por el Pacífico Norte, Polinesia Francesa y Pacífico Sur, sin embargo, con mayor número de infecciones reportadas fue en América, gracias a que la presencia de los vectores en regiones altamente pobladas y tropicales donde las personas son susceptibles a la infección ³.

El virus de Zika fue considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un grave problema de salud pública ya que se incrementaron los casos de malformación congénita y trastornos neurológicos relacionados con el virus de Zika, tales como la microcefalia, síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalitis y mielitis ³.

1.1 Epidemiología

El virus de Zika se aisló por primera vez en 1947 en el Bosque de Zika en Uganda; a partir de un mono Rhesus que formaba parte de un estudio de investigación en busca del virus de la fiebre amarilla. En 1948, el virus también se aisló de *Aedes africanus* y los primeros casos reportados de infección en humanos se registraron en 1952, también en el continente africano. Entre los años 1951 y 1981, hubo evidencia de infecciones causadas por el virus de Zika en humanos en África y Asia ^{4,5}. El primer brote causado por el virus de Zika fuera de África y Asia fue en 2007, que se registró en la Isla Yap, en el Pacífico Occidental. Durante este brote la enfermedad se manifestó con los siguientes síntomas: conjuntivitis, erupción en la piel y artralgia por lo que al inicio fue confundido como chinkungunya o dengue, sin embargo, en muestras de pacientes sospechosos se encontró el ARN del virus de Zika. Se reportaron 49 casos confirmados y 59 no confirmados, sin hospitalizaciones ni muertes. En 2010, se reportaron algunos casos esporádicos de infecciones relacionadas con el virus de Zika en países del sureste de Asia, como Tailandia, Camboya, Malasia, Indonesia y Filipinas ⁶.

Para los años 2013 y 2014, se reportó una gran epidemia del virus de Zika en la Polinesia Francesa, en la que se estima que aproximadamente el 11% de la población buscó tratamiento médico debido a la sospecha de una infección por el virus; este brote se debió a una relación entre el bajo nivel de inmunidad preexistente contra el virus de Zika y una alta población de los vectores de mosquitos de esa área, sin embargo, la mayoría de estos casos clínicos fueron similares al brote en la Isla Yap de 2007 y solo una pequeña fracción se reportó como casos graves asociados con complicaciones neurológicas, tales como el síndrome de Guillain- Barré. El número de casos relacionados con el síndrome de Guillain-Barré en la Polinesia Francesa aumentó aproximadamente 20 veces ^{7,8}.

El origen del virus de Zika dentro de la Polinesia Francesa es desconocido, pero está genéticamente relacionado con las cepas que se aislaron dentro de la Isla Yap en 2007 y de Camboya en 2010. Al poco tiempo del brote de la Polinesia Francesa, el virus de Zika se extendió a las islas vecinas en el Océano Pacífico Sur, entre las que incluye Nueva Caledonia,

Islas Cook e Isla de Pascua. También hubo reportes de casos en otros países lejanos como Australia, Italia, Japón y Noruega ⁹.

En 2015 se detectó la primera transmisión autóctona del virus de Zika en la parte noreste de Brasil, posteriormente se fue expandiendo en aproximadamente 14 estados brasileños, sin embargo, durante este brote el número de recién nacidos con microcefalia aumentó en áreas afectadas por el virus de Zika. En el año de 2016 de los casos notificados de sospecha con microcefalia, algunos fueron diagnosticados erróneamente o se informaron en exceso, por lo que gracias a este hallazgo, algunos estudios en la Polinesia Francesa demostraron que hubo un aumento de casos de microcefalia y otras anomalías fetales después del brote del virus de Zika en los años 2013 – 2014 ¹⁰⁻¹².

Gracias a la relación filogenética entre las cepas asiáticas, oceánicas y sudamericanas del virus de Zika, estas últimas asociadas aparentemente con la introducción del virus en Brasil por los participantes del “Va’a World Sprint Championship” y los viajeros asiáticos durante la Copa Mundial de la FIFA ^{13,14}. Por otra parte, en el año 2015, el calentamiento global y el cambio climático asociado con el fenómeno meteorológico “El niño” en el norte y el este de Sudamérica, pudieron haber acelerado la propagación del vector y el virus de Zika en Brasil ¹⁵.

Desde el brote de Brasil, el virus de Zika se extendió a un ritmo alarmante en gran parte de América Central y del Sur, y el Caribe la posibilidad del vínculo entre la microcefalia con el virus de Zika, llevó a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara a la infección por el virus de Zika como una “emergencia de salud pública de nivel internacional” en febrero del 2016 ^{16,17}. Para noviembre de 2016, hubo una tendencia a la baja de casos relacionados con el virus de Zika en todos los países y territorios que fueron afectados por el virus en América, exceptuando México, Panamá, Islas Turcas y Caicos. Hasta el momento son 20 países de América que han reportado 2311 casos confirmados de síndrome congénito asociado con el virus de Zika ¹⁸.

1.2 Transmisión

El virus de Zika, como otros flavivirus, se transmite por mosquitos principalmente del género *Aedes* (*Stegomyia*); se ha aislado de *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes furcifer* y *Aedes vittatus*^{19,20}, sin embargo, dos especies de este género *A. aegypti* y en menor proporción *A. albopictus* fueron relacionados con la mayoría de los brotes del virus de Zika, aparte de que son las únicas especies conocidas de *Aedes* en América, se encontró que ambas tienen una competencia baja como vector pero similar para la cepa del virus de Zika del genotipo asiático^{21,22}.

A pesar de que ambas especies están asociadas con los recientes brotes del virus de Zika, se ha visto que *A. aegypti* tiene una mayor capacidad vectorial ya que se alimenta principalmente de la sangre de humanos²³. Tanto *A. aegypti* como *A. albopictus* se encuentran ampliamente distribuidos en las zonas tropicales y subtropicales, sin embargo *A. albopictus* se encuentra en áreas más templadas que *A. aegypti*, por lo que esto hace que sea más favorable para extender su rango potencial donde pueden ocurrir brotes²⁴.

La adquisición del virus por mosquito probablemente ocurre durante una ingesta de sangre; posterior a la absorción, el virus se replica y se transmite a un animal de reserva (que puede ser el humano) en la próxima ingesta de sangre. Gracias a la identificación del virus o de anticuerpos contra el virus de Zika en varios primates no humanos y otros animales, se sugiere que hay múltiples especies de animales reservorios. También se sabe que el período de incubación del virus dentro del mosquito es de aproximadamente 10 días²⁵. Existen otros modos de transmisión no vectorial del virus de Zika que incluyen: transmisión congénita, perinatal y sexual; transmisión por transfusión sanguínea, mordedura de animales y exposición en laboratorios; sin embargo, la transmisión por vectores es la principal (**figura 1**).

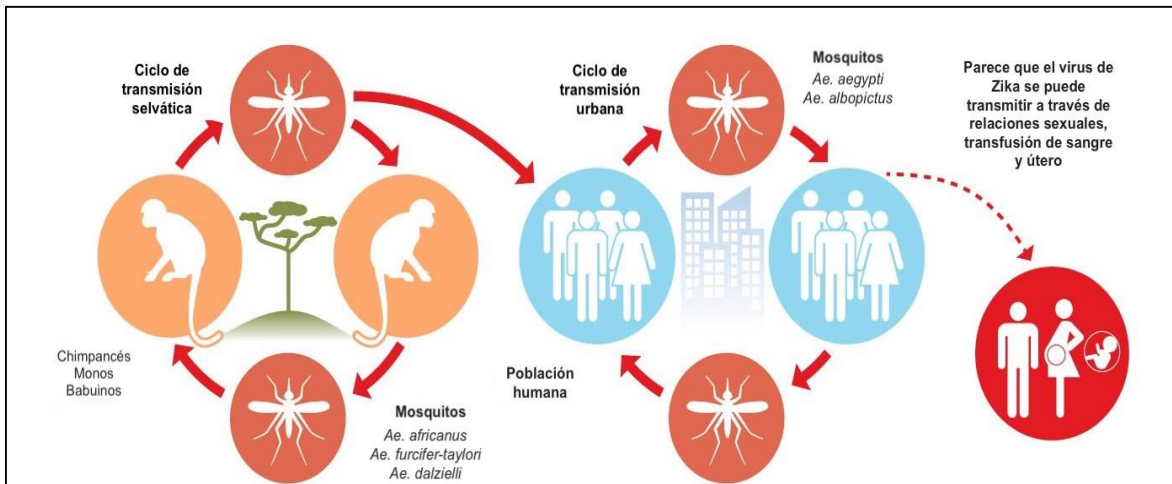


Figura 1. Ciclo de Transmisión del virus de Zika. Tomado y modificado de www.cfr.org/background/zika-virus

1.2.1 Transmisión sexual

Hay varios informes de casos que indican que el virus de Zika se puede transmitir a través del contacto sexual. En 2008 se reportó el primer caso de transmisión sexual del virus de Zika en Colorado, Estados Unidos; se trataba de un paciente que no había viajado a regiones endémicas y presentaba síntomas típicos por una infección por el virus de Zika, sin embargo la paciente informó que tuvo relaciones sexuales sin protección con su esposo, que estuvo en Senegal y fue diagnosticada positiva para el virus de Zika ²⁶. A partir de esto, hubo varios reportes que indicaron que el virus de Zika podría ser transmitido por contacto sexual.

La mayor parte de los estudios han informado sobre la transmisión sexual del virus de Zika en mayor proporción de hombres a mujeres, sin embargo, también se publicó la transmisión sexual de mujer a hombre y de hombre a hombre ²⁷⁻²⁹. Diversos estudios señalaron que el principal modo de transmisión sexual es el coito vaginal sin protección con un 96%, seguido de contactos orales con un 18% y anales con un 7.4% ³⁰, por lo que, se consideró la transmisión sexual como una de las fuentes más probables de infección. Los pacientes que fueron infectados con el virus de Zika vivían en regiones que se encontraban libres de mosquitos del género *Aedes* y tuvieron relaciones sexuales sin protección con parejas que habían estado en áreas infectadas por el virus de Zika y presentaban síntomas de

la enfermedad, sin embargo, también hubo casos reportados de pacientes que involucraban principalmente hombres asintomáticos (**figura 2**)³¹.

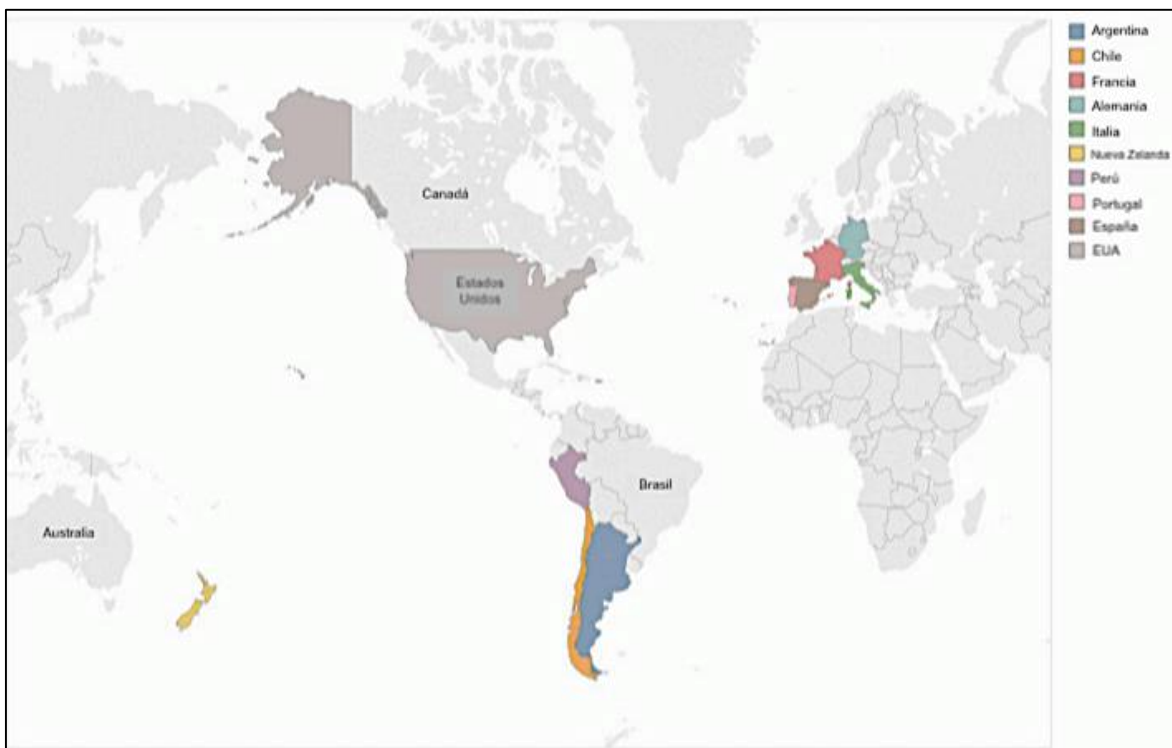


Figura 2. Países que reportaron transmisión sexual del virus de Zika del año 2011 al año 2016.

Tomado y modificado de Moreira et al.,2017³⁰.

El virus de Zika está presente en el semen en niveles más altos que en orina y sangre, detectado a través del ARN viral, lo que indica que la transmisión sexual es una de las rutas más relevantes de transmisión del virus de Zika³². Se ha encontrado que el semen de un paciente fue positivo para el ARN al virus de Zika después de 6 meses del inicio de los síntomas, aunque la partículas infecciosas solo se detectaron en el semen hasta 69 días después de la infección^{33,34}.

En un estudio en el que se incluyeron 150 pacientes, se encontró que sólo en un pequeño porcentaje de pacientes masculinos se detectó el ARN del virus de Zika dentro de los 3 meses después de la infección por el virus³⁵. También se detectó el virus de Zika en una muestra de mucosa cervical de una mujer que se recolectó 11 días después de que inició la enfermedad, sin embargo, las muestras de orina y sangre no fueron positivas al virus. En

estudios posteriores, se demostró que 1 de cada 50 mujeres infectados por el virus de Zika es positiva para el ARN viral en secreciones vaginales ^{35,36}.

1.2.2 Transmisión secundaria

El virus de Zika puede detectarse en varios fluidos corporales tales como sangre, leche materna, saliva, orina, sudor, lágrimas, semen y fluidos vaginales, esto sugiere una transmisión de modo secundario para el virus de Zika, lo que significa que el virus podría transmitirse durante una transfusión sanguínea o bien durante la lactancia ³⁷.

Las muestras de sangre de pacientes infectados son comúnmente positivas para el virus de Zika, sin embargo, tanto la viremia y el título viral son más bajos en comparación con la orina o el espermatozoide. En algunos estudios se ha reportado que aproximadamente el 28% de los pacientes presentaron viremia, mientras que el 3% se mostró clínicamente asintomático. La mayoría de las personas infectadas por el virus de Zika son asintomáticas, por lo que el riesgo de una infección por transfusión sanguínea es alta ³⁸.

En el año de 2016 se tuvo conocimiento de la transmisión del virus de Zika por transfusión sanguínea, lo que la convirtió en una preocupación importante de salud pública, esto llevó a la recomendación de la detección en donantes de sangre y productos sanguíneos para reducir el riesgo de transmisión ³⁹.

La leche materna se sugirió como posible modo de transmisión para la infección por el virus de Zika debido a tres casos clínicos, ya que se detectó mediante RT-PCR la presencia del virus en la leche materna y se confirmó la infección en dos recién nacidos que fueron amamantados. En estos casos se presentaron los síntomas de erupción maculopapular sin efectos adversos sobre el crecimiento o función cerebral del producto, los datos de estos estudios sobre la transmisión por leche materna son escasos, por lo tanto, se necesita una mayor recopilación de datos clínicos para un mejor análisis. Por otra parte, la OMS no impuso restricciones para la lactancia materna y dio la recomendación de iniciar la lactancia después de 1 hora posterior al parto ⁴⁰.

Una buena opción para la detección del virus de Zika es la saliva. Un estudio encontró que aproximadamente el 57% de las muestras recolectadas resultaron positivas para el antígeno del virus de Zika. La detección del virus en saliva fue mayor que en la sangre, lo que sugiere que las glándulas salivales son sitios para la replicación del virus de Zika que pueden ser una fuente de transmisión del virus, así como desempeñar un papel importante en brotes esporádicos en áreas no endémicas. También se detectó el virus en muestras de saliva hasta 29 días después del inicio de la enfermedad, donde permanece detectable por más tiempo que en la sangre ^{41,42}.

El virus de Zika se encontró en la mayoría de las muestras de orina en un estudio de investigación. El ARN viral se detectó hasta 20 días después del inicio de los síntomas, período mayor comparado con las muestras de sangre. También ha habido informes de detección tardía del ARN del virus de Zika en la orina, por lo que se sugirió la posibilidad de una replicación viral dentro del tejido renal. El virus de Zika en la orina sigue siendo infeccioso pues se obtuvieron varios aislamientos de muestras de orina. A pesar de estos datos no hay casos documentados de infección ante una exposición a la orina, sin embargo, esto no significa que no se debe considerar a las muestras de orina como una fuente potencial de infección y tratarse como material de riesgo biológico (**Tabla 1**) ^{43,44}.

Tabla 1. Detección del ARN del virus de Zika de diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	Técnica de detección	Tiempo de la detección
Sangre	qRT-PCR	Aproximadamente dentro de los 5 a 7 días después del comienzo de los síntomas
Suero	qRT-PCR y detección basada en anticuerpos	Aproximadamente dentro de los 5 a 6 días después del inicio de los síntomas
Semen	qRT-PCR	El ARN del virus de Zika fue detectado hasta 62 días después del comienzo de síntomas
Orina	qRT-PCR	Aproximadamente dentro de los 15 días después del inicio de los síntomas
Saliva	qRT-PCR	El ARN del virus de Zika fue detectado hasta 20 días después del inicio de los síntomas
Tabla tomada y modificada de Sharma and Lal.,2017 ⁴⁵		

1.2.3 Transmisión intrauterina

La infección materna por el virus de Zika ha sido asociada a consecuencias adversas fetales e infantiles que incluye microcefalia, anomalías cerebrales y déficits visuales y auditivos, sin embargo, los mecanismos de la transmisión congénita sigue sin aclararse completamente ^{46,47}. La mayoría de las investigaciones sobre este problema se han enfocado principalmente en la transmisión materno-fetal transplacentaria del virus de Zika, esto se debe principalmente a que la placenta juega un papel importante en la prevención de la transmisión de patógenos, considerando que actúa como una barrera física gracias a la respuesta inmune innata y adaptativa materna ^{48,49}.

A pesar de que la placenta cuenta con dichas características de protección no es capaz de evitar todas las infecciones que pueden lleguen al feto y se pueden presentar de manera congénita infecciones por *Toxoplasma gondii* y citomegalovirus, entre otros, debido a que los patógenos pueden eludir algunas funciones físicas y de defensa de la placenta para transferirse de tejidos maternos al feto ^{50,51}; tomando en cuenta estos antecedentes, hay estudios para tratar de explicar los mecanismos posibles por los cuales el virus de Zika es capaz de causar una infección fetal y al mismo tiempo tratar de explicar los mecanismos responsables de las secuelas adversas observadas entre los lactantes con infección congénita por el virus de Zika como se muestra en la **figura 3** ^{52,53}.

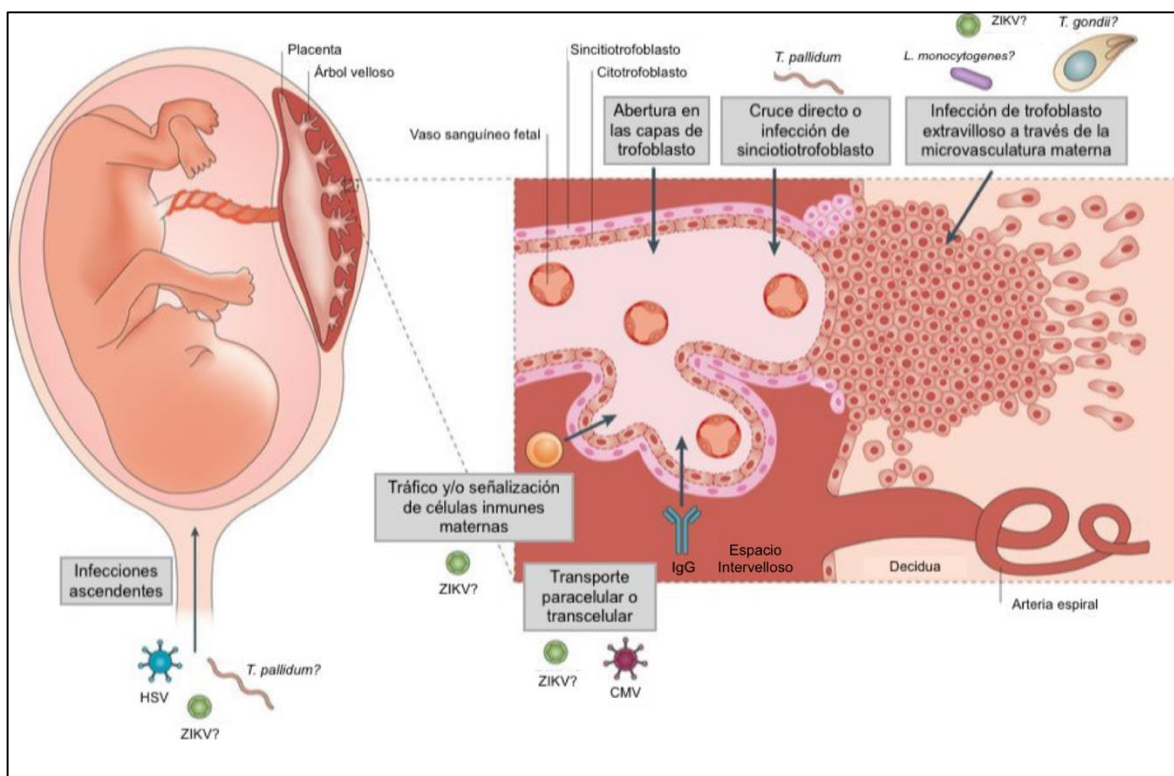


Figura 3. Vías utilizadas por los patógenos TORCH para traspasar la barrera placentaria. Existen varias vías por las cuales el virus de Zika y otros TORCH (*Toxoplasma gondii*, virus de la rubéola, citomegalovirus (CMV), virus del herpes simplex (HSV)) puede transmitirse verticalmente y pueden infectar por diferentes vías o rutas dependiendo de la etapa gestacional. Tomada y modificada de Coyne and Lazear.,2016.¹⁷⁵

1.3 Manifestaciones clínicas de la infección por el virus de Zika

El virus de Zika causa una amplia variedad de síntomas clínicos, en casos graves puede causar enfermedades neurológicas, tales como el síndrome de Guillain- Barré en adultos y microcefalia en bebés nacidos de mujeres que fueron infectadas con el virus de Zika.

El período de incubación del virus de Zika es de 3 a 12 días y la enfermedad por lo general suele ser leve, por lo que, las tasas de enfermedad grave y letalidad son muy bajas; generalmente los síntomas de la enfermedad se resuelven entre los 2 y los 7 días y tras la primera exposición, una persona desarrolla inmunidad y no vuelve a desarrollar la enfermedad en el futuro^{9,54}.

Aproximadamente del 20 al 25% de las personas infectadas por el virus de Zika presentan síntomas, en estos casos, los síntomas más comunes son erupción macular o papular, fiebre de 37.4 a 38 °C, artritis o artralgia, conjuntivitis no purulenta, mialgia, dolor de cabeza, dolor retroorbital, edema y vómito ⁵⁵. Entre otros síntomas que se han observado y que han sido asociados a infecciones agudas se incluyen náuseas, diarrea, ulceración de la membrana mucosa, dolor abdominal, prurito, trombocitopenia, hematospermia, dificultades auditivas y sangrado subcutáneo ⁵⁶⁻⁵⁹.

1.3.1 Complicaciones clínicas durante la infección por el virus de Zika

Las principales complicaciones causadas por el virus de Zika en mujeres embarazadas incluyen microcefalia y otras malformaciones cerebrales en el bebé. Las infecciones en adultos son asociados con el síndrome de Guillain- Barré (SGB) (**figura 4**) ^{60,61}.

La transmisión vertical origina que un agente sea capaz de causar una enfermedad de la madre al bebé en el útero o bien después del nacimiento; esto puede ocurrir a través de la placenta, leche materna o por contacto directo durante el proceso del parto, sin embargo, para que esto sea posible la madre debió ser infectada durante el embarazo (**figura 4**). ^{62,63}.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos se informó de un caso en enero de 2016 en el que un bebé nació con microcefalia en Oahu, Hawái, resultó positivo para la infección por el virus de Zika, y es probable que la madre se haya infectado en mayo del año 2015 y por consiguiente haya transmitido la infección al bebé; en posteriores estudios esto fue apoyado gracias a que se detectó el genoma del virus de Zika junto con anticuerpos IgM específicos en el líquido amniótico de dos mujeres embarazadas de Brasil, lo que mostró que el virus fue capaz de traspasar la barrera placentaria para infectar al feto. En otras investigaciones enfocadas en el brote de la Polinesia Francesa del año 2013 reportaron que dos madres juntos con sus recién nacidos tenían el virus de Zika, esto se confirmó por medio de la detección del genoma, demostrándolo que muestra una evidencia más de la transmisión vertical ⁶⁴⁻⁶⁶.

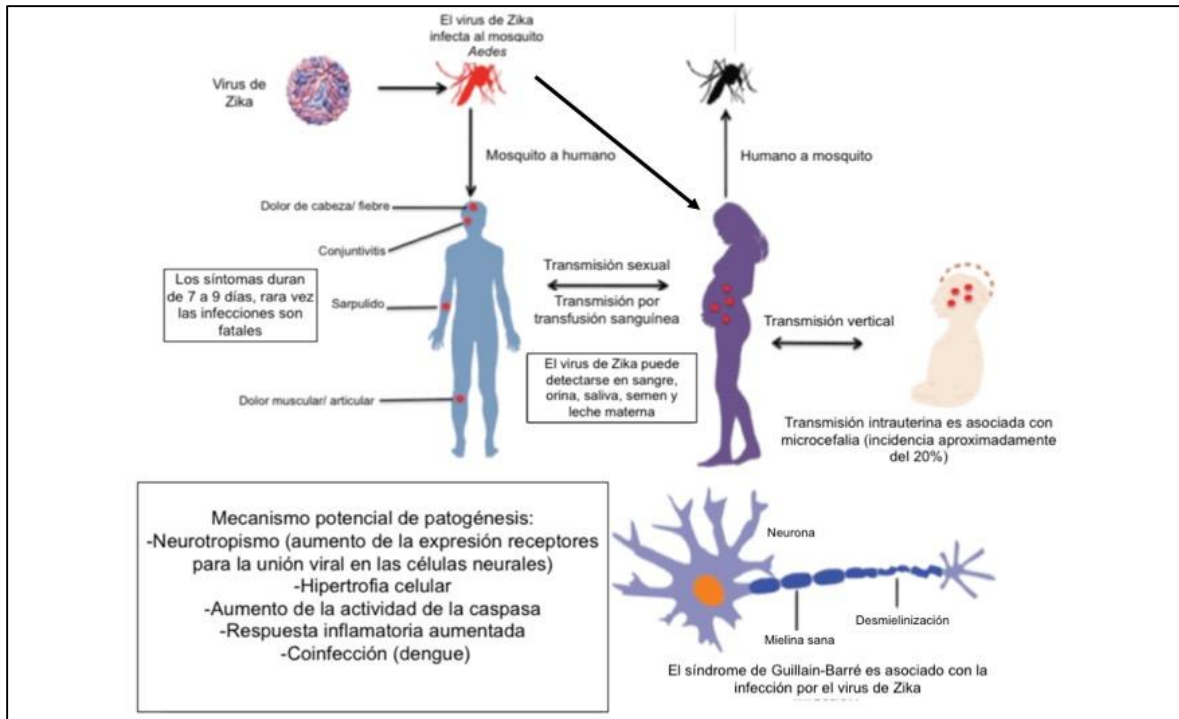


Figura 4. Complicaciones clínicas causadas por el virus de Zika. Hay diferentes modos de transmisión del virus de Zika, entre los síntomas que destacan la infección son: dolor de cabeza, fiebre, conjuntivitis, sarpullido y dolor muscular/articular, sin embargo, el virus de Zika es asociado con dos condiciones clínicas patológicas críticas (microcefalia y síndrome de Guillain-Barré). Tomada y modificada de Haque and Pant.,2017 ¹⁷⁶.

La microcefalia congénita es una anomalía neurológica que se define como una condición en la que la circunferencia de la cabeza de un bebé al nacer es <-2 desviaciones estándar (DE) por debajo de la media para el sexo, la edad y origen étnico, por otro lado, la microcefalia severa se define para una circunferencia de la cabeza <-3 SD en comparación con los bebés de la misma edad y sexo gestacional ^{9,12,63}. Aún no se conocen con claridad las causas del desarrollo de microcefalia en la infección por el virus de Zika, sin embargo, se postula que se debe a la destrucción dentro del útero de neuroprogenitores, células neuronales del feto y a la presencia de moléculas persistentes que se asocian a una respuesta inflamatoria; también hay vías de señalización inflamatorias en las células progenitoras neuronales que son cruciales para una respuesta inmune eficiente, por lo que, estas vías pueden ser activadas por el virus de Zika dando como resultado una regulación negativa dentro del ciclo celular, un deterioro en la progresión del ciclo celular, al igual que una disminución en la proliferación y apoptosis neuronal ^{57,63}.

Dentro de las infecciones congénitas, el virus de Zika se relaciona con la ventriculomegalia, la cual es capaz de provocar hidrocefalia, que es un aumento de la presión del líquido cefalorraquídeo dentro de los ventrículos del cerebro humano. Un estudio realizado en dos niños, que tuvieron manifestaciones clínicas consistentes con el síndrome congénito por el virus de Zika, y con el antecedente de que las madres durante sus embarazos experimentaron fiebre y erupción cutánea en el segundo trimestre, al nacer presentaron microcefalia, además de ventriculomegalia, atrofia cerebral grave y calcificaciones subcorticales, apuntando a un síndrome congénito por el virus de Zika ^{67,68}.

Generalmente los síntomas en adultos se presentan como conjuntivitis, fiebre leve, dolor de cabeza, erupción cutánea y diarrea, sin embargo, también hay manifestaciones clínicas como artralgia, síndrome de Guillain- Barré y anomalías cardiovasculares.

La artralgia se caracteriza principalmente por dolor en articulaciones causando lesiones que afectan los ligamentos, bolsa o tendones que rodean las articulaciones y también causa inflamación de las articulaciones. El virus de Zika está asociado con esta afección, que se caracteriza por síntomas como el bloqueo de las articulaciones, pérdida del movimiento de la articulación e inflamación articular. La patogénesis de la artralgia en pacientes con la infección es desconocida, sin embargo, hay estudios que asocian la acreditación de la artralgia a la edad avanzada, como una enfermedad comorbilidad o la viremia en curso que conduce a respuestas inmunes en pacientes infectados con el virus de Zika ^{69,70}.

En estudios recientes, se observó la relación entre el virus de Zika y el síndrome de Guillain-Barré, mostrando que ha aumentado el número de casos en diferentes países. El síndrome de Guillain- Barré es una condición desmielinizante en el que el sistema inmune del cuerpo ataca el sistema nervioso periférico; esta condición suele ocurrir unos días después de haberse expuesto al virus, parásito o incluso algunas bacterias, si esta condición no se trata de manera oportuna, un paciente puede morir por complicaciones, como infecciones en la sangre, coágulos pulmonares, paro cardíaco y parálisis de los músculos ^{71,72}.

Hay investigaciones en las que observó una correlación positiva entre pacientes adultos infectados con el virus de Zika y la posibilidad de desarrollar síndrome de Guillain-Barré; el estudio fue realizado con 39 pacientes que tenían un diagnóstico confirmado con síndrome de Guillain- Barré después de que compararon el control de casos, observaron que el mayor factor de riesgo del síndrome de Guillain- Barré en pacientes con el virus de Zika fue una enfermedad aguda en los dos meses previos, por lo que debe haber una observación para la prevención del virus de Zika en lugares epidémicos después de una enfermedad aguda con bacterias o virus ^{9,71}.

1.4 Genoma del virus de Zika

El genoma completo del virus de Zika de la cepa africana (MR 766) se secuenció por primera vez en 2007. El genoma del virus de Zika está formado por una molécula de ARN de cadena sencilla con sentido positivo con un tamaño de aproximadamente 11 kb. Los viriones tienen aproximadamente 60 nm de tamaño y son de forma esférica ^{73,74}. El genoma del virus contiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una sola poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos; este marco de lectura está flanqueado por dos regiones no codificantes ubicadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral con aproximadamente 106 y 428 nucleótidos de longitud respectivamente, como se muestra en la **figura 5** ⁷⁵.

En comparación con los ARN mensajeros celulares, el genoma del virus de Zika carece de una cola poli A en el extremo 3', sin embargo, termina con un di nucleótido CU_{OH} conservado. La poliproteína codificada por el único marco de lectura abierto es escindida por proteasas celulares y virales en tres proteínas estructurales: la cápside (C), la proteína de premembrana/ membrana (prM/M) y la de envoltura (E); además de siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B y NS5). Estos sitios de escisión siguen patrones establecidos para otros virus transmitidos por mosquitos, por lo que los residuos de cisteína dentro de la poliproteína están conservados al igual que otros flavivirus, como se observa en la **figura 5B** ^{75,76}.

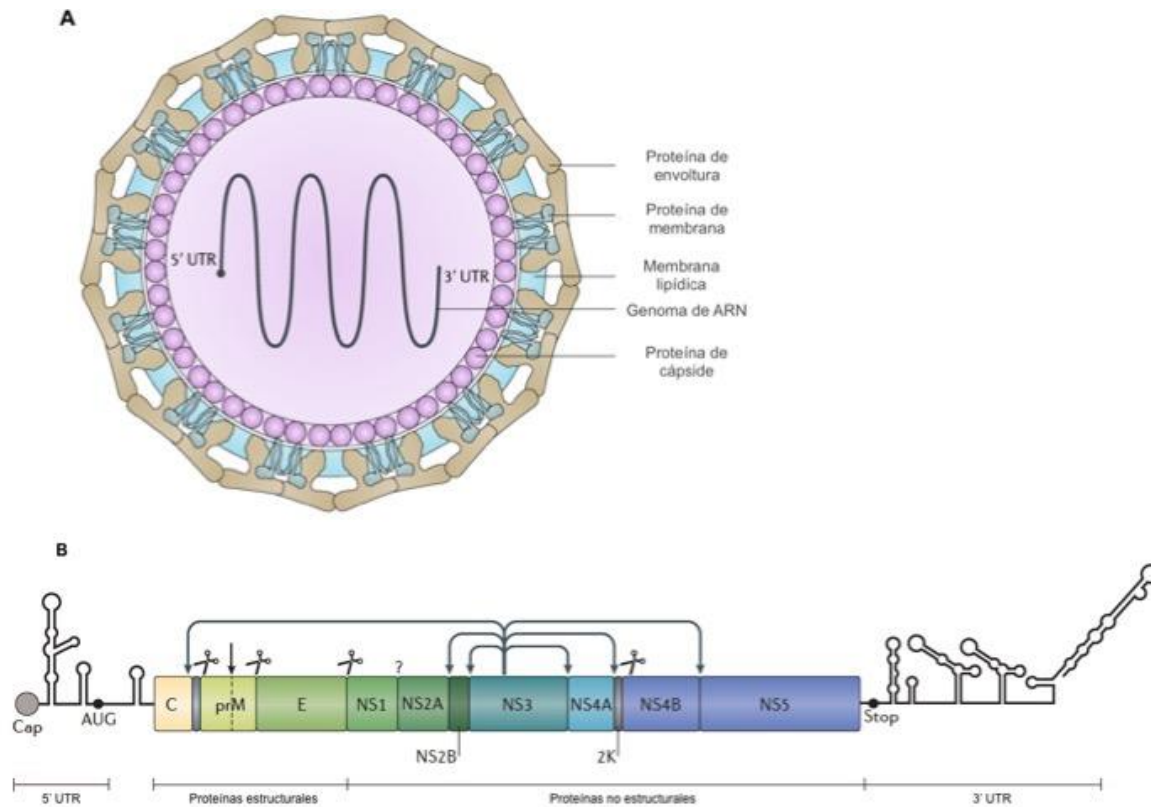


Figura 5. Estructura y organización del genoma del virus de Zika. La partícula del virus de Zika esta constituida por una copia de una molécula de ARN de cadena sencilla con sentido positivo la cual esta ensamblada por las tres proteínas estructurales (A). El genoma del virus de Zika esta constituido por un marco de lectura abierto de aproximadamente 10 kb y que codifica tres proteínas estructurales y siete proteínas estructurales, también esta compuesta por dos regiones no codificantes en los extremos 5' y 3'; la escisión de la poliproteína por la peptidasa celular se indica con tijeras mientras que la escisión por la proteasa viral se indican por flechas y la flecha vertical negra junto con una línea punteada indica la escisión por la proteasa furina procedente del aparato de Golgi para la maduración de la proteína prM a M (B). Tomada y modificada de Abbink et al.,2018 y Neudeldt et al.,2018 ^{177,178}

1.4.1 Proteínas estructurales y no estructurales del virus de Zika

Las tres proteínas estructurales participan principalmente en el ensamblaje de los viriones. La proteína C se asocia con el ARN genómico y forma la nucleocápside de los viriones, mientras que la proteína E media la unión del receptor celular al virus, promoviendo la fusión de los viriones con las membranas endosómicas de la célula blanco durante la entrada viral ⁷³. En cuanto a la función de prM, ayuda al plegamiento de la proteína E como una especie de chaperona y así evita la fusión prematura de las partículas antes de ser liberadas de la célula infectada, la escisión de la proteína prM en proteína M es lo que se conoce como la maduración de los viriones ^{77,78}.

Las proteínas no estructurales desempeñan un papel en la virulencia, replicación, secreción o patogenicidad y son los principales factores de selección positiva del virus de Zika. En cuanto a la proteína NS1, su estructura está bien conservada en todos los flavivirus y su detección mediante anticuerpos específicos se usa para el diagnóstico de una infección por flavivirus; su tamaño es de 46 a 55 kDa y existe como un monómero intracelular. El papel que desempeña la NS1 glicosilada es vital para la replicación viral y la modulación de la respuesta inmune de la célula blanco, diferentes sitios en esta proteína, (específicamente del virus de Zika) son únicos de otros flavivirus. Estas modificaciones se seleccionan positivamente, por lo que no se encuentra como un objetivo principal para tratamientos debido a su alta tasa de mutación^{79,80}.

NS2B es una proteína pequeña que funciona como activador para la proteína NS3, mientras que NS3 contiene un dominio de proteasa viral y uno de helicasa, ambas funciones vitales para llevar a cabo la replicación viral. La proteasa viral cataliza la hidrólisis de los enlaces entre en NS2B- NS3, NS3-NS4A, NS4A-NS4B y NS4B- NS5, para formar las proteínas maduras. La función de la proteasa NS3 es importante, y aunque algún inhibidor podría reducir la formación de los viriones y la infección, por ello es uno de los principales objetivos de estudio para el tratamiento de enfermedades causadas por flavivirus^{81,82}.

NS4B es una proteína transmembranal responsable del anclaje del complejo de replicación, evasión de la respuesta inmune, tiene diversas interacciones especializadas con factores de la célula blanco y un efecto antagonista sobre el interferón. Se han encontrado inhibidores para NS4B para otros flavivirus, sin embargo, no han tenido efecto sobre la NS4B del virus de Zika, por lo que aún está en investigación el desarrollo de inhibidores enfocados en esta proteína del virus de Zika^{81,83}.

La proteína NS5 tiene una actividad de metiltransferasa en el extremo N- terminal, así como un dominio de ARN polimerasa dependiente de ARN por lo que es esencial para la replicación viral y su tasa de mutación. La metiltransferasa es esencial para el procesamiento del ARN viral gracias a su actividad GTP- transferasa, mientras que su dominio de ARN

polimerasa dependiente de ARN es vital para la formación del iniciador de ARN y es un objetivo para desarrollar fármacos ya que aparte de su función, se ha encontrado que hay una variación mínima en este dominio en diferentes flavivirus, lo que pudiera significar que compuestos similares deberían funcionar para diferentes flavivirus ⁸¹.

1.4.2 Replicación del virus de Zika

La replicación del virus de Zika es similar a otros flavivirus que ya fueron estudiados; el virus penetra la célula hospedera a través de endocitosis mediada por receptores. Los receptores de la membrana de la célula se unen a la proteína del virión maduro del virus de Zika, desencadenando así la endocitosis (**figura 6, paso 2 y 3**), gracias al ambiente ácido que se encuentra dentro del endosoma induce a cambios conformacionales de la proteína E y permite que se fusione con la membrana endosómica, para poder liberar el genoma viral en el citoplasma (**figura 6, paso 6 y 7**) ^{84,85}.

Posteriormente llega a la superficie del retículo endoplásmico, donde se crea un entorno molecular favorable para dar lugar a que continúe la replicación viral, al tiempo que evita la señalización de respuesta al interferón ^{86,87}.

El genoma del virus de Zika es al mismo tiempo un ARN mensajero, por lo que, la traducción se inicia inmediatamente después de su liberación; la parte N-terminal de la poliproteína naciente contiene una señal de localización hacia el retículo endoplásmico, se forma una poliproteína que posteriormente es escindida tanto por las proteasas celulares como virales (**figura 6, paso 8**) ⁸⁶⁻⁸⁹.

Tras el procesamiento de la poliproteína, el genoma viral se replica en la membrana del retículo endoplásmico, por actividad de las proteínas no estructurales, que forman un complejo de replicación; primero, la ARN polimerasa dependiente de ARN (proteína NS5) copia el ARN positivo de cadena sencilla a una molécula de cadena doble, posteriormente la helicasa del extremo C-terminal de NS3 desenrolla y remodela el ARN de doble cadena en hebras de ARN de cadena sencilla con sentido positivo y negativo por separado.

Posteriormente, la cadena sencilla con sentido negativo servirá de molde para sintetizar el ARN de doble cadena, por lo que se obtiene una vez más un ARN de doble cadena que nuevamente es desenrollada y remodelada por la helicasa de NS3, dando como resultado dos cadenas sencillas de ARN individuales una de sentido negativo y otra de sentido positivo. Por un lado, tenemos que el ARN de cadena sencilla con sentido negativo puede ser reutilizado para poder sintetizar múltiples moléculas de ARN de cadena sencilla y por otra parte, el nuevo ARN de cadena sencilla con sentido positivo es metilado gracias a la metiltransferasa del extremo N de NS5, lo que constituye el nuevo genoma viral (**figura 6, paso 9**)^{87,90,91}.

La molécula de ARN de cadena sencilla en sentido positivo metilado, las proteínas C, E y prM se ensamblan para poder formar los viriones inmaduros en el retículo endoplásmico, estos viriones inmaduros tienen un diámetro aproximadamente de 60 nm con la proteína C del lado interno de la membrana lipídica junto con la superficie trimérica de los heterodímeros de E y prM (**figura 6, paso 10**)^{92,93}.

Una vez ensamblados y formados los nuevos viriones, en esta etapa inmaduros, salen del retículo endoplásmico para entrar al aparato de Golgi y así madurar en la red del trans-Golgi, gracias a que hay una disminución del pH, lo que favorece la reorganización del heterodímero E-prM, que se encuentra en forma de trímero en el virión inmaduro para poder estar en un conjunto de homodímeros de E en forma paralela a la superficie viral. Esta reorganización estructural provoca la escisión de prM por la proteasa de la célula hospedera, furina, lo que induce la completa maduración del virión. Esto reduce el diámetro del virión de 60 nm a aproximadamente 50 nm e induce la exocitosis de la nueva progenie viral (**figura 6, paso 10-13**)^{94,95}.

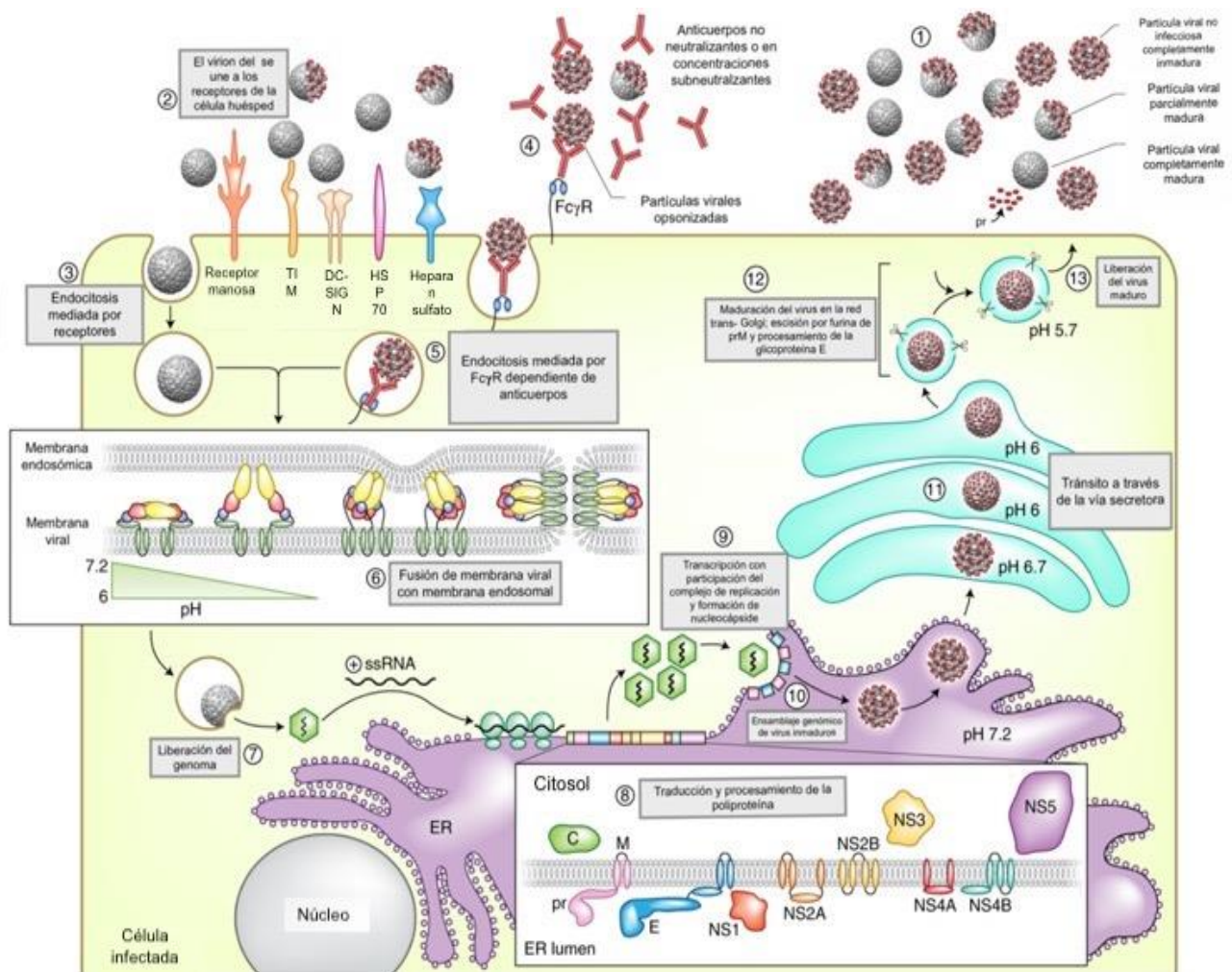


Figura 6. Replicación de los flavivirus. Los viriones de los flavivirus existen como una mezcla de estructuras completamente maduras, parcialmente maduras y completamente inmaduras, esto va a depender del grado de escisión de la proteína pr/M (1). El virión se une a la superficie de las células susceptibles a través de las interacciones de factores de unión o mejor conocidos como receptores (2), y esta unión es seguida por interacciones con receptores secundarios y por clatrina o caveolina que median la internalización a través de la endocitosis (3). Por otra parte, en presencia de anticuerpos no neutralizantes (4), las partículas virales opsonizadas pueden internalizarse a través de endocitosis mediada por el receptor Fcγ (5). La acidificación del endosoma desencadena la trimerización de la proteína E provocando la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal (6), liberando así el genoma viral en el citoplasma (7). El genoma viral se traduce y procesa antes de que comience la replicación (8). Una vez obtenidas el número de copias del genoma viral se recluta formando la nucleocápside (9), y el ensamblaje se inicia brotando en el retículo endoplásmico (ER) (10). Los virus inmaduros siguen la vía secretora (11), en la que gracias a la disminución del pH de la red trans- Golgi desencadena la maduración a través de la escisión de la proteína prM mediada por la proteasa de furina (12). Los viriones nacientes son secretados de la célula y se libera pr de la superficie viral (13). Tomada y modificada de Slon Campos et al.,2018 ¹⁷⁹

1.5 Interacciones entre el virus de Zika y la célula hospedera

El virus de Zika tiene un extenso tropismo y persistencia tanto en tejidos como en fluidos corporales, esto puede ayudar a entender las manifestaciones clínicas y epidemiológicas que han sido observadas. Existen diferentes líneas celulares que han sido identificados para probar la infectividad de las cepas del virus de Zika, las cuales se muestran en la **Tabla 2**. Dentro de las ventajas del uso de líneas celulares, se incluyen que son de fácil manejo y bajo costo, sin embargo, la mayoría de las líneas celulares se han modificado genéticamente para su inmortalización por lo que una desventaja es no mostrar un perfil molecular preciso en la infección del virus de Zika, por otra parte cuando se hace uso de las líneas celulares para probar la infección por el virus de Zika, los datos obtenidos deben interpretarse con cuidado y tomar en cuenta factores como el número de paso del inóculo viral, el sistema de cultivo celular usado y las especies usadas para la propagación del virus pues esto puede llegar a influir en el fenotipo observado ⁹⁶.

El virus de Zika infecta y desencadena muerte en las células progenitoras neuronales, aunque también es capaz de infectar en menor grado neuronas maduras, esta capacidad que tiene el virus de Zika tanto de infectar como dañar a las células progenitoras contribuye al impacto que tiene durante el desarrollo neurológico del cerebro. Los estudios en modelos animales, han mostrado que el virus de Zika es capaz de causar una inhibición en la diferenciación de células neuroprogenitoras, puede causar muerte celular y problemas en la corteza cerebral ⁹⁷⁻⁹⁹. También se observó, mediante la inoculación intracraneal directa en modelos de estudios de infección congénita que el virus puede causar un agotamiento de células madre proliferativas en la zona ventricular, al igual que puede causar una interrupción de las neuronas piramidales corticoespinales. La infección de células de la cresta neural puede producir citocinas inflamatorias que actúan de manera paracrina que agotan las reservas de las células progenitoras neuronales, promoviendo la apoptosis ^{100,101}.

Tabla 2. Líneas celulares permisivas y para la propagación del virus de Zika

Líneas celulares	Tipo de células
293 T	Línea celular epitelial de riñón embrionario humano
A549	Línea celular de carcinoma de pulmón humano
ARPE19	Línea celular de epitelio pigmentado de la retina
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano
COS7	Línea celular de riñón de mono verde africano
DF-1	Línea celular de fibroblastos de embrión de pollo
HaCaT	Línea celular de queratinocitos humanos
HFL	Línea celular de fibroblastos de pulmón embrionario humano
JEG- 3	Línea celular de coriocarcinoma placentario humano
LNCaP	Línea celular de adenocarcinoma de próstata metastásico humano
PK- 15	Línea celular epitelial de riñón de cerdo
SF268	Línea celular de astrocitoma anaplásico humano
SH- SY5Y	Línea celular de neuroblastoma de médula ósea humana
C6/36	Línea celular derivada de la larva del mosquito <i>Aedes albopictus</i>
MOS61	Línea celular derivada del mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>
AP- 61	Línea celular derivada del mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>
BHK- 21	Línea celular de fibroblastos de riñón de bebé de hámster
LLC- MK2	Línea celular epitelial de riñón de mono Rhesus
Vero E6	Línea celular de riñón de mono verde africano
Tabla construida con los datos de las siguientes referencias: ¹⁰²⁻¹⁰⁶	

En estudios sobre infecciones en humanos se ha detectado el ARN del virus de Zika en tejidos maternos y fetales que incluyen sangre del cordón umbilical, varios tipos de células de placenta, líquido amniótico y cerebro humano fetal y neonatal en desarrollo. También se detectó la presencia del virus en cerebro y placenta de fetos humanos que fueron abortados espontáneamente durante el primer y segundo trimestre. De igual manera, se ha demostrado que el virus de Zika es capaz de replicarse en células de Hofbauer (macrófagos placentarios), trofoblastos y células endoteliales, sin embargo, se ha demostrado que tanto la edad gestacional y la variación genética son factores de la madre infectada que pueden tener un efecto de vulnerabilidad relativa para los tipos de células de la placenta y que sean permisibles y susceptibles a la infección por el virus de Zika ^{53,107,108}.

Durante la infección puede haber persistencia de virus infecciosos en varios fluidos corporales (semen, saliva, lágrimas y orina) y órganos blancos inmunoprivilegiados (ojos, cerebro y testículos) y el tracto genital femenino. También se puede detectar en la córnea, nervio óptico y retina neurosensorial y el virus infeccioso se puede recolectar del líquido conjuntivo humano ^{109,110}.

Se ha detectado el ARN viral en el moco cervical humano después de 11 días que iniciaron los síntomas, una vez que el virus ha sido eliminado de la sangre y orina; también hay evidencia de la presencia del virus en secreciones vaginales durante más de 11 semanas. Hasta el momento, se ha encontrado que los fibroblastos uterinos humanos son susceptibles a la infección por el virus de Zika, estos estudios pueden sugerir que una infección uterina contribuya con la infección y daño fetal ^{36,111}.

Estudios en modelos de ratones han demostrado que el virus de Zika en ratones machos conduce a la infección de espermatogonias y células de Sertoli; destruye los testículos y reduce el recuento de espermatozoides móviles, también se muestran niveles bajos de hormonas sexuales asociados con la reducción de la fertilidad, lo cual se debe principalmente al daño que hay en los testículos ^{112,113}.

Con base en estudios previos en otros flavivirus, se han propuesto varias proteínas como principales receptores responsables para la entrada del virus de Zika en la célula blanco. En cuanto al sistema nervioso central se tiene el antecedente que son receptores transmembranales tipo RMM (receptor de membrana de manosa) principalmente en astrocitos y microglía. El receptor, DC-SIGN (*dendritic cell- specific intercelular adhesion molecule- 3- grabbing non- integrin*) o CD209, se encuentran principalmente en las células dendríticas, células perivasculares del sistema nervioso central y vasos cerebrales ¹¹⁴.

Los fibroblastos dérmicos humanos, queratinocitos epidérmicos y células dendríticas inmaduras también son permisivas para el virus de Zika, se han propuesto varios receptores propuestos como son: DC-SIGN, Axl, Tyro-3 y en menor medida TIM-1, que son capaces de permitir la entrada del virus, parece ser que el de mayor relevancia es el receptor AXL. También se ha observado que el virus de Zika induce la transcripción de los receptores TLR3,

RIG-1 y MDA5, así como la estimulación de varios genes en la activación del interferón β entre los que se incluyen: OAS2, ISG15 y MX1 ^{114,115}.

2 ANTECEDENTES

2.1 Receptores celulares en la entrada del virus de Zika

Se han identificado varias moléculas de la célula que podrían servir como posibles factores de unión o receptores para la entrada de los flavivirus. La primera sugerencia han sido los glicosaminoglicanos que incluyen el receptor de heparán sulfato. Se ha observado principalmente en sus residuos de lisina en las posiciones 291 y 295 en el dominio III de la proteína E se ha implicado principalmente esta interacción ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Otra de las moléculas de mayor impacto es el receptor de adhesión intercelular específica de células dendríticas o mejor conocido como DC-SIGN o CD209; este tipo de receptores se expresan principalmente en macrófagos y células dendríticas y se ha observado que son los principales objetivos durante una infección del virus del dengue al igual que el virus de Zika, sin embargo, también pueden hacer uso de un homólogo de los receptores en células endoteliales del hígado y ganglios linfáticos que se llaman DC- SIGNR, L-SIGN o CD209L ^{115,119,120}.

Dentro de los receptores identificados en la entrada de los flavivirus en la célula, están los receptores de fosfatidilserina (PS) que incluyen a las proteínas de las familias TIM y TAM; estos receptores están involucrados en la detección de la fosfatidilserina o en la señal de “cómeme” en las membranas de las células apoptóticas, desencadenando la fagocitosis de estas células muertas; ambas familias juegan un papel importante en la señalización inmune debido a un dominio que se encuentra del lado del citoplasma. El virus del dengue y el de West-Nile, entre otros muchos virus envueltos parecen utilizar en gran extensión estos receptores para el ingreso a la célula mediante un proceso llamado “imitación apoptótica”, puesto que estos receptores son únicos porque se unen a los fosfolípidos, por lo que se hipotetiza que se unen a estos lípidos en lugar de glicoproteínas. De forma general, los miembros de la familia TIM se unen de manera directa a los lípidos, mientras que los miembros de la familia TAM se unen de forma indirecta, es decir utiliza ligandos como las proteínas específica de detención del crecimiento 6 (Gas6) y la proteína S (ProS) ^{84,115,121-123}.

2.2 Receptores TIM

Las proteínas de la familia TIM (inmunoglobulina transmembranal y dominio de mucina) desempeñan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria que incluyen alergia, asma, tolerancia al trasplante, autoinmunidad y respuesta a infecciones virales ¹²¹. Esta familia de proteínas consta de ocho miembros (TIM 1-8) en el cromosoma de ratón 11B1.1 y tres miembros (TIM-1, TIM- 3 y TIM- 4) en el cromosoma humano 5q33.2; en estudios en los genes de esta familia de proteínas confirmaron que la expresión, la función y la estructura de las proteínas TIM en ratones son ortólogos de los humanos ¹²⁴⁻¹²⁶.

Los genes TIM codifican glicoproteínas de la superficie celular tipo I que tienen características estructurales similares, incluyendo un dominio en el extremo N-terminal similar a las inmunoglobulinas (Ig), un dominio de mucina con residuos O-glicosilaciones y N-glicosilaciones cercanos a la membrana, también cuenta con un dominio transmembranal y una región citoplasmática en la región C-terminal con motivos de fosforilación de tirosina, a excepción de TIM- 4, como se observa en la **figura 7** ¹²⁴.

Se ha demostrado que los receptores TIM-1, TIM-3 y TIM-4 son receptores que reconocen la fosfatidilserina (PtdSer), la cual es un fosfolípido que se encuentra localizado en la cara interna de la membrana plasmática, pero se redistribuye y se expone en la membrana externa cuando la célula sufre apoptosis, proporcionando esta señal para reconocer estas células y poder dar un componente esencial en la homeostasis tisular y una regulación inmune. Esta familia de proteínas TIM tiene un repertorio funcional para el reconocimiento de células apoptóticas, determinando si este reconocimiento a las células apoptóticas conlleva a la activación o tolerancia inmunitaria, lo cual depende de la molécula TIM que está involucrada al igual que la célula en la que se está expresando ^{127,128}.

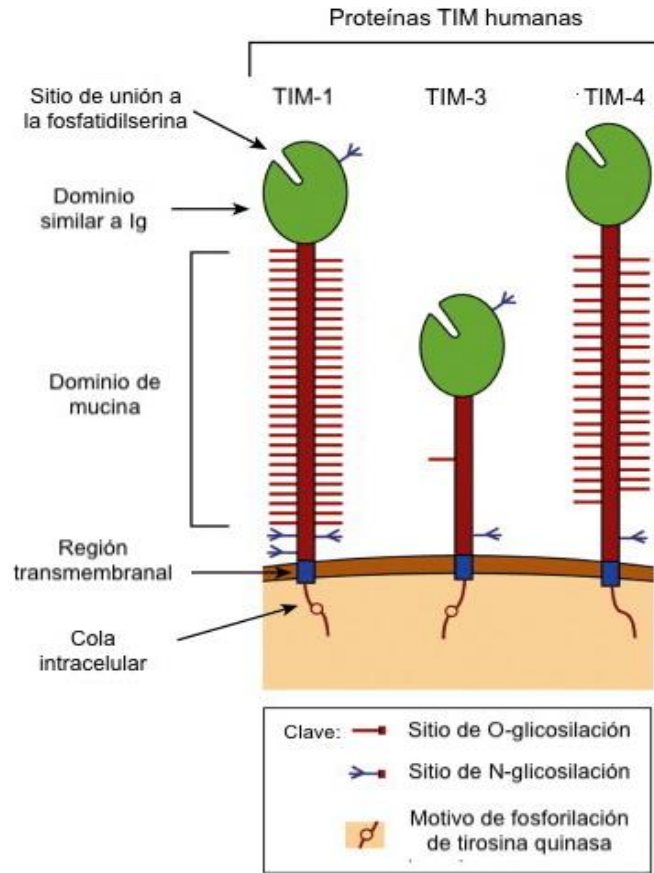


Figura 7. Estructura de las proteínas de inmunoglobulina y dominio de mucina (TIM) de células T humanas. L porción extracelular de las proteínas TIM humanas esta altamente conservada, con dominio N-terminal similar a la inmunoglobulina V (IgV) adyacente a un dominio similar a mucina, el cual está glicosilado en diferentes grados en las diferentes proteínas TIM, TIM-1 y TIM-4 tienen la mayor cadena cantidad de cadenas de glicano. Las colas intracelulares contienen un motivo de fosforilación de tirosina-quinasa, también cuentan con un sitio de unión a la fosfatidilserina en el dominio similar a la inmunoglobulina V. Tomada y modificada de Angiari and Constantin,2014¹⁸⁰

Las moléculas TIM-1, TIM-3 y TIM-4 tienen diferencias en su estructura molecular y sus patrones de expresión lo que sugiere que tienen funciones distintas en la regulación de las respuestas de las células T. TIM-1 se expresa en células T CD4⁺ activadas, en células Th2 diferenciadas, también se expresa en mastocitos y a niveles bajos en una subpoblación de células B. Al inicio se describió que esta molécula era una proteína que se encontraba en las células epiteliales renales las cuales al alza y son eliminadas después de una lesión en el riñón y juega un papel importante en la homeostasis de los tejidos al facilitar la eliminación de células apoptóticas y necróticas del túbulo lesionado¹²⁹⁻¹³¹.

La proteína TIM-1 se relacionó por primera vez con la entrada de un virus envuelto como un receptor específico para los filovirus, se observó que TIM-1 favorece la entrada del virus a través de la unión con PtdSer, esto se debe a que cuenta con un dominio de “bolsillo” transmembranal que se une con este fosfolípido que se encuentra entre los dos bucles de su dominio de inmunoglobulina. Se ha visto que los residuos conservados de aspartato y asparagina están involucrados en la coordinación de un catión, formando puentes de hidrogeno con los grupos fosfatos y serina de PtdSer; esta unión en condiciones y funciones nativas permite la eliminación de células apoptóticas y la regulación de células inmunes. Hay varios virus que contienen PtdSer en la superficie del virión. ¹³²⁻¹³⁵.

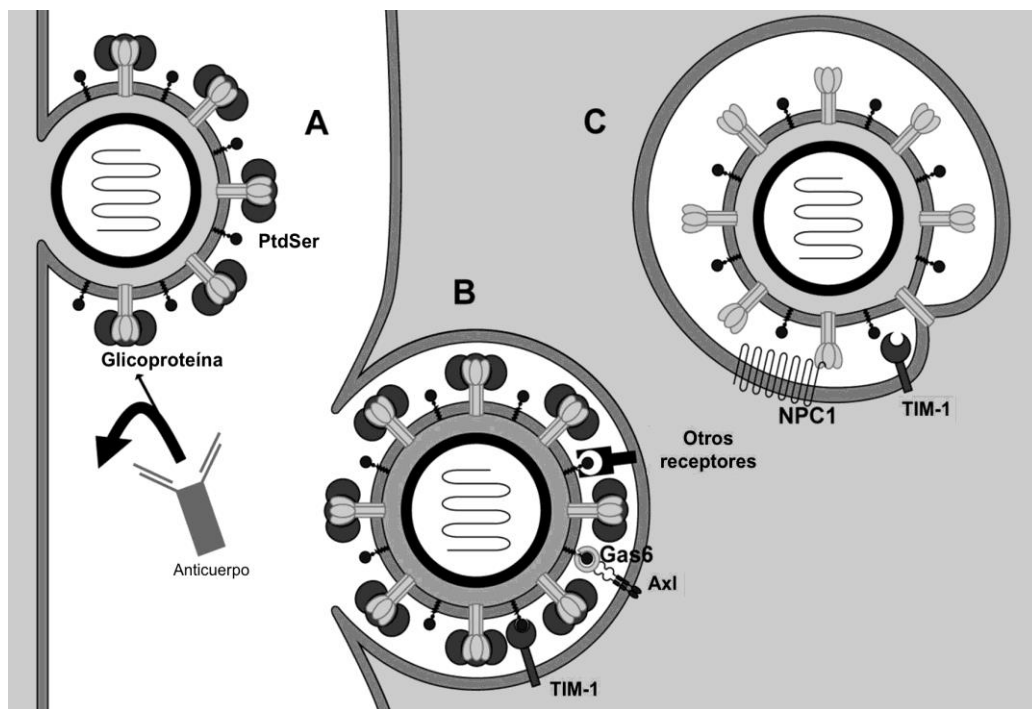


Figura 8. Modelo para la absorción del virus mediada por fosfatidilserina. El virus brota de la superficie celular después de la infección, incorporando la glicoproteína y PtdSer en la envoltura viral (A). La captación del virus por células adyacentes es posible gracias a la interacción entre la PtdSer y los receptores de la familia de proteínas TAM y TIM permiten mediar la entrada del virus (B). Gracias a las condiciones dentro del endosoma permite que promueva la fusión entre la glicoproteína y la membrana endosomal (C). Tomada y modificada de Moller-Tank et al., 2013 ¹³³

Se ha demostrado que la proteína TIM-1 podría facilitar la infección de una amplia variedad de virus envueltos que no se encuentran relacionados, pero que al unirse a PtdSer asociada al virión, podría apoyar a la internalización del virus; entre las familias virales involucradas en la entrada mediada por TIM-1 se encuentra filovirus, alfavirus, flavivirus y algunos otros (**figura 8**). Hay un fenómeno que se denomina “imitación apoptótica”, la cual se describió por primera vez para el virus de la vacuna, sin embargo, durante este estudio no se vio implicado ningún receptor celular mediado por PtdSer; también se ha comprobado que la disminución de PtdSer en la superficie de los viriones maduros genera la inhibición en la infección por lo que esto sugiere que TIM-1 es muy importante para su absorción a través de la unión de PtdSer asociada al virión ^{123,136,137}.

2.3 Receptores TAM

El nombre de esta familia de proteínas proviene de la primera letra de las tres moléculas que lo componen Tyro-3, Axl y Mer; pertenecen a la subfamilia de receptores de las proteínas tirosina quinasas (PTK) y son fundamentales para mantener la supervivencia celular y la homeostasis en mamíferos ^{138,139}.

De forma individual los receptores TAM se expresan en diversas células de forma distinta. Por un lado, Tyro-3 se expresa en el sistema nervioso central, riñones, ovarios y testículos; mientras que Axl se expresa de forma ubicua o en la mayoría de las células humanas que se originan de fuentes hematopoyéticas, epiteliales y mesenquimales; y por último, Mer se expresa en ovarios, testículos, próstata, pulmones, riñones y en menor medida en timo, bazo, hígado, intestino delgado, colon y placenta. Los receptores TAM se encuentran activos en: células presentadoras de antígeno, monocitos, células NK del sistema inmunitario, osteoclastos en el hueso, células Sertoli en testículos, células endoteliales, células vasculares del músculo liso y células epiteliales pigmentadas de la retina ^{138,140}.

Las características estructurales de esta familia de receptores es que tienen regiones extracelulares que son sitios de unión para su ligando, este dominio extracelular consta de dos estructuras relacionadas con la inmunoglobulina y dos repeticiones de fibronectina tipo

III, cada una en tándem, seguidas de un dominio transmembranal hidrofóbico de un solo paso, que es seguido por una porción intracelular que incluye un dominio de tirosina cinasa, varios sitios de fosforilación y un motivo conservado que es un inmunoreceptor tipo ITIM. Los tres receptores pertenecientes a la familia TAM se activan de manera dependiente de la concentración de la proteína Gas6 y de la proteína ProS1; ambas proteínas son solubles y dependientes de la vitamina K. Las dos son proteínas solubles que comparten un 42% de identidad proteica, no obstante, Gas6 activa todos los receptores TAM, mientras que, la proteína ProS1 solamente activa Tyro-3 y Mer, como se observa en la **figura 9** ¹⁴¹⁻¹⁴³.

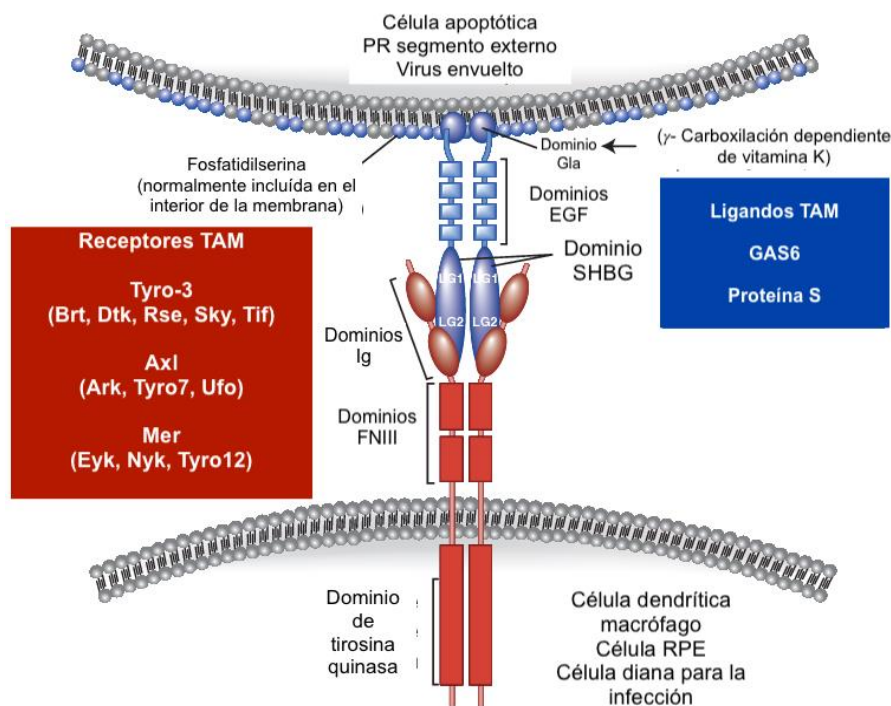


Figura 9. Receptores y ligandos TAM. Los receptores TAM son: Tyro-3, Axl y Mer, estos receptores se expresan ampliamente en las células del sistema inmune, nervioso, vascular y reproductivo maduro. Los ligandos de TAM (en color azul) son GAS6 y proteína S (Pros1). Sus dominios C-terminal SHBG de los ligandos se unen a los dominios de inmunoglobulina (Ig) de los receptores, inducen dimerización y activan las tirosinas quinasa. Cuando se carboxila en una reacción dependiente de la vitamina K, los dominios N-terminal Gla de los ligandos diméricos se unen a la fosfatidilserina que esta expresada en la superficie de las célula apoptótica o virus envuelto. Tomada y modificada de Lemke,2013 ¹⁴⁵

Los dos ligandos de los receptores TAM (Gas6 y ProS1), tienen dos características estructurales que son clave para sus actividades; la primera consiste de un dominio similar a la globulina de unión a la hormona sexual en el extremo carboxilo terminal que está compuesto por dos dominios de laminina G, este dominio es el que se une a los dominios Ig

de los receptores e induce a su dimerización y posteriormente a la activación de la cinasa; la segunda es un dominio Gla en su extremo amino terminal que se γ - carboxila en presencia de la vitamina K; ambos dominios ya mencionados se encuentran separados por cuatro dominios de cuatro repeticiones de tipo EGF; el dominio Gla es rico en residuos de ácido glutámico cuyos grupos γ - hidroxilo se carboxilan postraduccionalmente, que es una modificación dependiente de la vitamina K ^{139,144,145}.

Debido a la γ -carboxilación de los dominios Gla los receptores TAM junto con sus ligandos son capaces de unirse a PtdSer. La mayoría de las células, cuentan con la actividad de un conjunto de P₄- ATPasas mejor conocidas como flipasas, lo que asegura que este fosfolípido se limite al lado interno de la membrana plasmática, es decir, hacia el citoplasma; debido a que estas flipasas se desactivan cuando PtdSer se expone en la superficie de la membrana celular; normalmente este fosfolípido se expone en las células apoptóticas y es una importante señal para ser reconocidas por los fagocitos ^{146,147}.

El papel de los receptores TAM se ha relacionado con infecciones virales a través del proceso de “imitación apoptótica”, mencionado anteriormente y que diversos estudios mostraron que la señal PtdSer se encuentra en la superficie de la membrana extracelular de varios virus envueltos que incluye el virus vacuna, citomegalovirus, el virus de la fiebre de Lassa y el VIH; sin embargo, en el caso de los receptores de la familia TAM no funcionan como receptores virales directos, debido a que, como ya se ha mencionado, co-participan con dos proteínas (Gas6 y ProS1) que sirven como “moléculas puente”, actuando entre una membrana que rodea la cápside del virus y la células que el virus infectará ^{137,148,149}.

Hay estudios que sugieren que la efectividad de la infección puede variar entre los tres miembros de la familia TAM, esto puede relacionarse con las diferencias en su afinidad de unión entre el receptor y su ligando o su expresión diferencial. Además, se ha visto que la unión a PtdSer es esencial para la eficacia de infecciosidad, que, en el caso de esta familia de receptores TAM, ocurre a través del dominio Gla de sus ligandos (Gas6 y ProS1); en diversos estudios se ha visto que la eliminación o la ausencia de este dominio no es indispensable para la entrada viral mediada por PtdSer. De manera similar, mutaciones en los residuos de unión

de Gas6 de la proteína Axl, inhiben la adsorción viral, por lo que esto indica que la eficacia entre los complejos ligando/ receptor requiere tanto la unión eficiente de PtdSer por el ligando como la unión del ligando por el receptor ^{150,151}.

Es importante recalcar que, en comparación con la familia de proteínas TIM, la señalización de la cola citoplasmática no es necesaria para mejorar la entrada viral en las células hospederas, la familia de proteínas TAM necesita de su dominio PTK debido a que es esencial para mejorar la infección viral. Se ha visto que el complejo Gas6/ Axl todavía puede mejorar la unión e internalización sin la actividad de la cinasa, sin embargo, comparando con células que expresan de forma natural Axl esto se ve afectado de manera significativa, debido a que la unión del ligando por los receptores y su asociación con el interferón tipo I conduce a una activación de STAT1 y la inducción del supresor de la señalización de citocinas, pues los virus utilizan esta vía de señalización antiinflamatoria para amortiguar la respuesta inmune y así poder promover la replicación. La señalización de los receptores TAM desencadenan la interacción con el ligando, la señalización se ve mejorada por la presencia viral ayudando a facilitar la interacción de los ligandos con los receptores ¹⁵¹⁻¹⁵⁴.

Se ha propuesto a Axl como receptor principal para la entrada del virus de Zika en una amplia variedad de células, entre ellas, células endoteliales humanas, células madre neuronales, astrocitos, microglía, células precursoras de oligodendrocitos., células placentarias, explantes-citotrofoblastos, células endoteliales, fibroblastos y células de Hofbauer en las vellosidades coriónicas, al igual que en células epiteliales amnióticas y progenitoras de trofoblasto en membranas amniocoriónicas ^{115,155}.

Se ha visto que la eliminación del receptor Axl en células progenitoras neuronales y organoides no disminuye la infección por el virus de Zika o la muerte celular; del mismo modo se pudo observar que la eliminación de este receptor en ratones no elimina la patología del virus de Zika, lo que sugiere que Axl no es el receptor principal en este tipo celular. Debido a que Axl es una molécula de señalización, hay probabilidades de que tenga múltiples

funciones involucradas en la infección por el virus de Zika, en la que algunas sean favorables y otras cuantas en contra de la infección viral ^{156,157}.

Como ya se mencionó, el virus de Zika puede infectar células placentarias primarias humanas y explantes de vellosidades coriónicas, se ha demostrado que tanto los receptores de las familias de proteínas TAM y TIM se expresan en estas células. Por un lado, TIM-1 tuvo una alta expresión en células donde la sangre materna perfundió la placenta que incluyen la decidua basal y las vellosidades coriónicas vecinas, por otro lado, la expresión de Axl como de Tyro-3 dependió de tres variables: el donante del explante, la edad gestacional y el tipo de célula; además al inhibir TIM-1 con un fármaco específico se logró inhibir parte de la infección viral, lo que sugiere que es uno de los probables receptores para la entrada del virus en células placentarias ¹⁰⁸.

Sin embargo, aún quedan por explicar muchas cosas sobre el papel de los receptores involucrados en la entrada de la infección por el virus de Zika, ya que, a pesar de que hay una especificidad tisular en la entrada viral y debido a su gran capacidad de infectar una diversidad de tejidos y células puede haber receptores que aún no se han identificado o bien aún quedan preguntas por responder acerca del mecanismo de infección con los receptores ya estudiados previamente.

2.3 Incorporación de la fosfatidilserina en la envoltura de los flavivirus y su interacción con los receptores TIM Y TAM

Los virus han desarrollado estrategias para contrarrestar los factores y funciones de la célula hospedera y así aseguran su entrada y replicación exitosa. Se sabe que los virus usan una estrategia denominada “imitación apoptótica viral” esto significa que es una manera de secuestrar el reconocimiento apoptótico esencial y los mecanismos de eliminación por sus propios medios. Este mecanismo describe que los virus imitan este proceso mediante la inclusión de PtdSer dentro de su membrana o envoltura viral, o bien mediante vesículas que contienen este fosfolípido, las cuales derivan de la célula infectada o célula hospedera; este es un mecanismo utilizado por muchas familias de virus para facilitar la unión viral, la entrada viral y la evasión del sistema inmunitario ¹²³.

El mecanismo que utilizan los virus para la incorporación de PtdSer es crítico, debido a que usan diferentes medios para incluir este fosfolípido en un proceso que depende en su mayoría del compartimento intracelular en el que se replican. Para los virus envueltos, la inclusión de PtdSer se logra gemando a través de los organelos intracelulares o desde la membrana plasmática; esto se debe a que la membrana del retículo endoplásmico es rica en PtdSer, y, por lo tanto, es una excelente fuente de lípidos para los virus que buscan incorporar este fosfolípido a su membrana. Entre los virus que usan este mecanismo de imitación apoptótica están los virus del dengue y de la vacuna (**figura 10**)^{158,159}.

Originalmente, este mecanismo se planteó como una estrategia de evasión inmune para explicar la infección silenciosa que emplea el virus de la hepatitis B, sin embargo, este proceso se relacionó por primera vez con poxvirus, ya que este virus secuestra la maquinaria de depuración apoptótica de las células para poder promover la internalización viral. Gracias a este hallazgo, se ha observado que la “imitación apoptótica” viral puede facilitar la unión, la entrada y la evasión para al menos 10 familias virales diferentes; es importante mencionar que para muchos de estos virus se han propuesto que los receptores de fosfatidilserina incluyen las familias TIM y TAM (**figura 10**)^{123,137,160}.

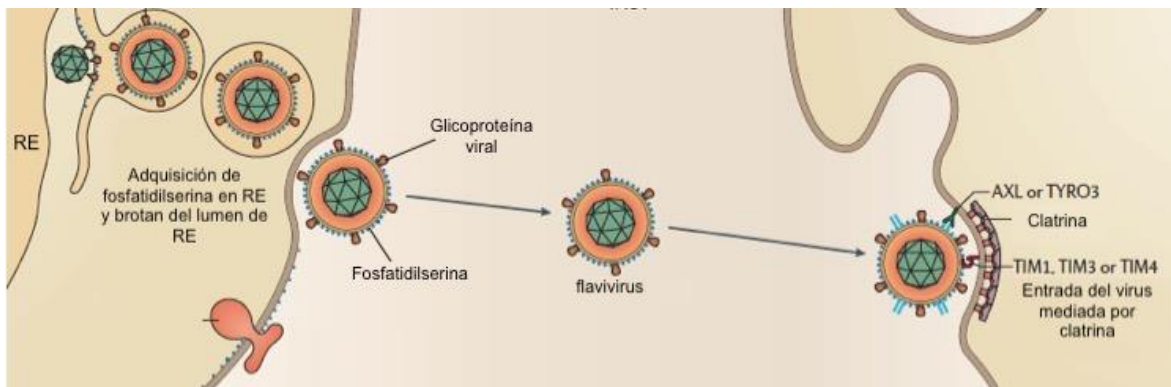


Figura 10. Adquisición de la fosfatidilserina en el Retículo Endoplásmico. Durante la “imitación apoptótica”, el virus envuelto adquiere la fosfatidilserina de la célula huésped y la incorpora a la membrana viral. La fosfatidilserina expuesta en la superficie viral se une directa o indirectamente a los receptores de fosfatidilserina como son la familia de las proteínas TAM y TIM, esto facilita la entrada del virus o la infección. Para virus envueltos como los flavivirus que incluyen el virus del dengue, la unión de fosfatidilserina en la superficie de la célula huésped induce la entrada del virus mediada por clatrina. Tomada y modificada de Amara and Mercer,2015¹²³

Dicho lo anterior, se ha observado un papel crucial de PtdSer y la mejora mediada por los receptores TIM y TAM de la infección por los flavivirus en general que sugiere que este fosfolípido puede estar asociado con la superficie de las partículas virales. Hasta el momento se sabe que la envoltura de los flavivirus se deriva de la membrana del retículo endoplásmico de la célula infectada y que está enriquecida en PtdSer, lo que parece indicar que los flavivirus podrían incorporar PtdSer en su envoltura viral cuando emergen del retículo endoplásmico ^{161,162}.

Mediante análisis estructurales se ha observado que los viriones maduros de los flavivirus están compuestos por una nucleocápside rodeada por una bicapa lipídica que deriva de la membrana de la célula infectada y que se encuentra cubierta de una glicoproteína externa, lo que esto lo hace imposible de que PtdSer sea accesible a los receptores TIM y TAM, sin embargo, hay estudios que demostraron que la estructura del virus del dengue es dinámica, la cual puede ser alterada por los cambios de temperatura que se pueden encontrar en el ambiente o de forma natural cuando el virus pasa de un mosquito a un hospedero humano; los viriones del dengue que se producen en células de mosquitos a 28°C y son expuestos a 34°C pueden mantener una conformación clásica en espiga lisa como las partículas maduras, no obstante, a temperaturas más altas los viriones podrían adoptar una conformación irregular la cual permitiría exponer zonas de la membrana viral y así permitir el acceso a los receptores TIM y TAM a la membrana viral (**figura 11**)^{163,164}.

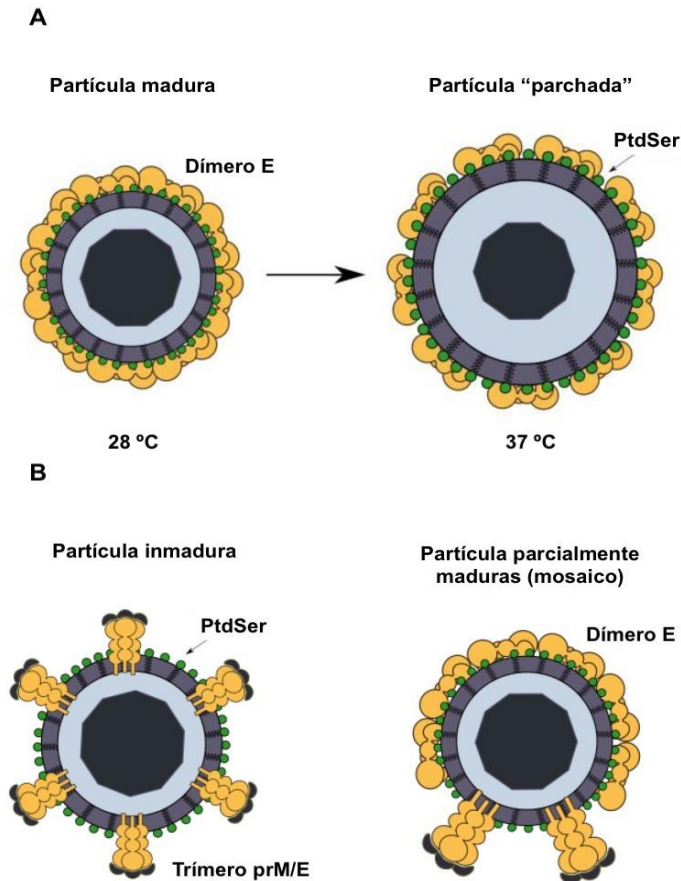


Figura 11. Posible mecanismo de exposición de la fosfatidilserina en los viriones de los flavivirus. Las partículas virales de los flavivirus a 28°C en células de mosquito tienen una conformación lisa en espiga cerrada que protege la envoltura lipídica del medio externo; tras un aumento de la temperatura estas partículas se expanden adoptando una conformación "irregular" lo que permite que sea accesible a la PtdSer asociado al virión (A). Por otra parte, la escisión ineficaz de la proteína prM por la furina celular conduce a la liberación de viriones inmaduros o parcialmente maduros (mosaico) por lo que la envoltura lipídica está expuesta al medio externo, esto permite que la PtdSer que esta asociada al virión es accesible para los receptores de la familia de las proteínas TAM y TIM (B). Tomada y modificada de Perera-Lecoin et al.,2013⁸⁴

Otra posible explicación para la inclusión de PtdSer en la envoltura de los flavivirus en general y su posible interacción con los receptores TIM y TAM, es el hecho de que cuando los viriones adquieren su envoltura lipídica durante la gemación de la nucleocápside en el retículo endoplásmico, las partículas inmaduras tienen una superficie puntiaguda, donde se disponen en 60 heterotrímeros de las proteínas E y prM, por lo que la proteína prM es procesada proteolíticamente por la proteasa celular furina durante su tránsito a través de la red de trans-Golgi, para que la obtención de los viriones maduros. Este proceso no es completamente eficiente y una cierta cantidad de la proteína prM sin procesar permanece

asociada con viriones lo que puede conducir a la liberación de una progenie de viriones inmaduros, parcialmente maduros y otros completamente maduros. En análisis estructurales de partículas inmaduras revela una superficie puntiaguda compuesta por los heterodímeros de prM y E, por lo que la envoltura viral podría estar expuesta en estas partículas inmaduras, lo que puede contribuir en gran medida a la interacción con los receptores TIM y TAM (figura 12)^{92,94,165,166}.

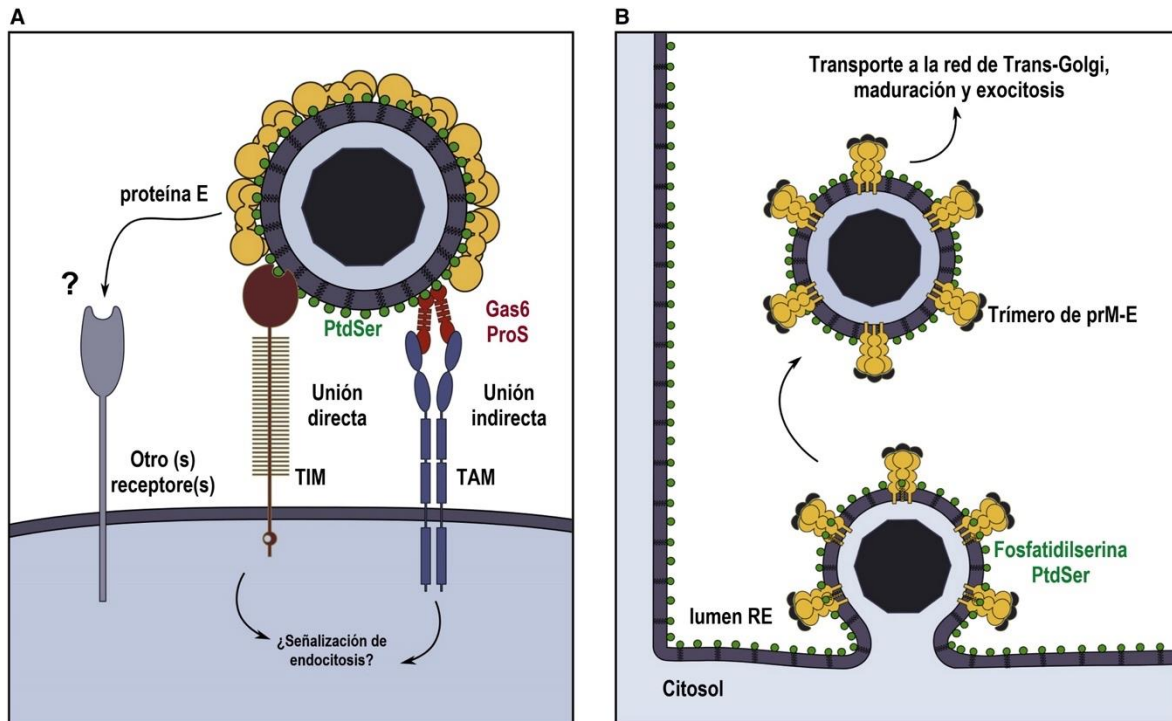


Figura 12. Adquisición de la fosfatidilserina en las partículas virales de los flavivirus y la mejora mediada por el receptor TIM y TAM de infección por flavivirus. Modelo de reconocimiento directo e indirecto del virión por los receptores TIM y TAM (A). Representación de la partícula viral y su adquisición de la PtdSer al brotar del RE (B). Tomada y modificada de Meertens et al., 2012 ¹⁵³

3. JUSTIFICACIÓN

La infección por el virus de Zika generalmente causa una enfermedad no grave, sin embargo, en los brotes registrándose en los últimos años se ha asociado con problemas importantes como microcefalia en bebés de madres infectadas y con la aparición del síndrome de Guillain-Barré, por lo que la OMS declaró la fiebre de Zika como una emergencia de salud pública de importancia internacional, poniendo en relieve la importancia de mejorar las medidas para poder reducir la infección por el virus, particularmente en mujeres embarazadas y en edad fértil; por ello es importante establecer modelos de estudio *in vitro* que estén al alcance de los laboratorios y nos permita entender los mecanismos de infección y transmisión viral.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para establecer la capacidad del virus de Zika para causar infección en diferentes linajes celulares es necesario estudiar las interacciones entre las moléculas de superficie celular y los viriones. Se sabe que hay algunos elementos celulares que pueden facilitar los procesos de entrada, replicación y salida viral, por lo que la determinación de estas moléculas, con función de receptores y que permiten la entrada del virus de Zika a la célula servirá de base a futuros estudios encaminados al desarrollo de estrategias para inhibir su infección y por lo tanto los efectos del virus. En este trabajo hemos planteado determinar si las proteínas Axl, Tyro-3 y TIM-1 están involucradas en la infección por el virus de Zika en la línea celular BHK-21.

5. HIPÓTESIS

Las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 están involucrados en la infección por el virus de Zika en la línea celular BHK-21.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

△ Determinar la interacción del virus de Zika con proteínas de membrana celular.

6.2 Objetivos específicos

△ Determinar la permisividad y susceptibilidad de la línea celular BHK-21 a la infección por el virus de Zika.

△ Determinar si las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 están presentes en la línea celular BHK-21.

△ Determinar si las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 están involucrados en la entrada del virus de Zika en la línea celular BHK-21.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cultivo celular

7.1.1 Células C6/36

La línea celular C6/36, son células adherentes que provienen de la larva del mosquito *Aedes albopictus* y es utilizada para la replicación de los flavivirus, entre ellos el virus del dengue y el virus de Zika. Se cultivaron en medio MEM en ausencia de HEPES y bicarbonato de sodio y con 10% de suero fetal bovino (SFB), se incubaron a 27 °C sin CO₂ y sin humedad.

7.1.2 Células BHK-21

La línea celular BHK-21, son células adherentes y forman monocapa que provienen del riñón de hámster neonato. Se cultivaron en medio DMEM con 10% de SFB e incubadas a 37 °C y CO₂ al 5%.

7.2 Propagación del virus de Zika

Se utilizó la cepa del virus de Zika (ZIKV-Mex-2016 A) obtenida del Laboratorio Central de Epidemiología del Centro Médico Nacional “La Raza” (IMSS). El virus se propagó en la línea celular C6/36, las cuales estuvieron a una confluencia del 80-90%. Se cultivaron en medio MEM con 5% de SFB para reducir el nivel de replicación celular durante los días de infección.

Cuando se observó efecto citopático (formación de vacuolas y lisis celular), se realizó la titulación viral y se almacenó a -70 °C en alícuotas hasta su uso.

7.3 Titulación del virus de Zika

Se utilizó el método de unidades formadoras de placas (UFP). Se prepararon monocapas confluentes de las células BHK-21 en placas de 12 pozos, mediante la adición de 2.5×10^6 células por pozo, se incubó a 37 °C, por 24 horas, la confluencia celular se observó bajo el microscopio. Cuando se alcanzó la confluencia celular de aproximadamente 90%, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de cloruro de sodio y fosfatos pH 7.2 (PBS).

Se prepararon diluciones seriadas del virus (factor 10) en medio MEM sin suero. Se adicionaron 0.3 ml de cada dilución a pozos individuales con las monocapas celulares. La adsorción del virus a las células se llevó a cabo por 60 minutos con agitación suave. El inóculo viral se retiró y las células se lavaron con medio MEM sin suero. Posteriormente se adicionó una mezcla de agarosa y medio MEM con SFB al 10% a cada pozo. Las placas se mantuvieron a 37 °C durante 3 días. Los cultivos se fijaron con ácido tricloroacético al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 1.25% en etanol 20%. Se contó el número de placas líticas en cada monocapa celular tomando en cuenta la dilución utilizada para realizar el cálculo de las unidades formadoras de placas/ ml de acuerdo con la siguiente fórmula: [(No. de placas) / (Vol. De inóculo ml)] x (inverso de la dilución) = PFU/ml.

7.4 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular BHK-21

La identificación de la infección por el virus de Zika se determinó por inmunofluorescencia mediante el uso de un anticuerpo que reconoce intermediarios de replicación de doble cadena de RNA presentes en las células infectadas por virus con genoma de RNA de cadena sencilla, se prepararon monocapas de células sobre cámaras-portaobjeto de 8 pocillos (Nunc Lab-Tek™ II, Thermo Scientific), se adicionaron de 2.4×10^5 células por pozo e incubaron a 37 °C por 24 h.

Se prepararon diluciones seriadas del virus (10^{-3} hasta 10^{-11} , factor 10) en medio DMEM sin suero y se adicionó cada dilución a los pozos individuales con las monocapas celulares. Se retiró el inóculo viral después de 1 h de adsorción, posteriormente se adicionó

DMEM con SFB al 10% a cada pozo y se incubó a 37 °C durante 24 h. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con PBST/ Triton X-100 al 25%, se bloquearon con PBST/ BSA al 1%. Los cultivos se incubaron con el anticuerpo primario IgG de ratón anti-RNA de doble cadena [rJ2] (Kerafast, ES2001) a una dilución 1:60 durante toda la noche a 4 °C. Este anticuerpo reconoce intermediarios de replicación de doble cadena de RNA presentes en las células infectadas por virus con genoma de RNA de cadena sencilla. Transcurrido el tiempo se lavó con PBST/BSA 1%, se adicionó el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón marcado con CFL 488 (Santa Cruz Biotechnology, sc-362259) a una dilución 1:200 y se incubó durante 2 h. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen, H1399) a una dilución 1:1000, incubando a temperatura ambiente de 10 a 15 min.

Se analizó con un microscopio invertido Zeiss, modelo Axio Observer A2, equipado con epifluorescencia con filtros de excitación a 430, 488, 594 y 633 nm, con sistema de seccionamiento óptico utilizando iluminación estructurada marca Zeiss modelo Apotome 2.

7.5 Identificación de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3 en la línea celular BHK-21

La identificación de los receptores Axl, Tyro-3 y TIM-1, se determinó por inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpos específicos para cada uno de los receptores tanto en células no infectadas como en células infectadas. Se prepararon monocapas de células sobre cámaras-portaobjeto de 8 pocillos, se adicionaron 2.4×10^5 células por pozo e incubaron a 37 °C por 24 h. Se prepararon las dosis a partir del título viral diluidas en DMEM sin suero y se adicionó cada dosis viral a los pozos individuales con las monocapas celulares. Se retiró el inóculo viral después de 1 h de adsorción, posteriormente se adicionó DMEM con SFB al 10% a cada pozo y se incubó a 37 °C durante 24 h. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con PBST/ Triton X-100 al 25%, se bloquearon con PBST/ BSA al 1%. Se incubaron con los anticuerpos primarios siguientes: IgG de cabra anti-Axl (R&D Systems, AF154), IgG de ratón anti-hTIM-1 (R&D Systems, MAB1750), IgG de ratón anti-hTYRO3/ DTK (R&D Systems, MAB859) a las diluciones 1:200, 1:500 y 1:500, respectivamente. Se incubaron 16 h a 4 °C, transcurrido el

tiempo se lavó con PBST/BSA al 1%, se adicionaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra marcado con CFL 594 (Santa Cruz Biotechnology, sc-362274) y anti-IgG de ratón marcado con CFL 488 (Santa Cruz Biotechnology, sc-362259) a una dilución 1:200. La incubación fue por 2 h en cada caso. Los núcleos se tiñeron con Hoechst a una dilución 1:1000 a temperatura ambiente de 10 a 15 min.

Se analizó con un microscopio invertido Zeiss, modelo Axio Observer A2, equipado con epifluorescencia con filtros de excitación de 430, 488, 594 y 633 nm, con sistema de seccionamiento óptico utilizando iluminación estructurada marca Zeiss modelo Apotome 2.

7.6 Bloqueo de los receptores en la línea celular BHK-21

Para confirmar la importancia de los posibles receptores involucrados en la infección con el virus de Zika en la línea celular BHK-21 se realizó el bloqueo mediante el uso de anticuerpos específicos para las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3. Posteriormente se determinó la cinética de infección viral por inmunofluorescencia mediante el uso de un anticuerpo específico que reconoce intermediarios de replicación de doble cadena de RNA presentes en las células infectadas por virus con genoma de RNA de cadena sencilla en células sin bloqueo y en células infectadas con bloqueo de receptor. Se prepararon monocapas en placas de 96 pozos, mediante la adición de 8×10^4 células por pozo, se incubó a 37°C, por 24 horas, transcurrido el tiempo las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de cloruro de sodio y fosfatos pH 7.2 (PBS). Se prepararon los anticuerpos anti-Axl, anti-hTIM-1, anti-hTYRO3 en DMEM sin suero a una concentración de 1 µg/ml y se adicionó a los pozos individuales con las monocapas celulares. En el caso de las células sin bloqueo solo se agregó medio DMEM sin suero, se incubaron por 1 h y se lavaron las células dos veces con PBS 1X. Se prepararon las dosis virales a partir del título viral en medio DMEM sin suero y se adicionó cada dosis viral a los pozos individuales con las monocapas celulares. Se retiró el inóculo viral después de 1 h de adsorción, posteriormente se adicionó DMEM con SFB al 10% a cada pozo y se incubó a 37 °C de 0 hasta 96 h.

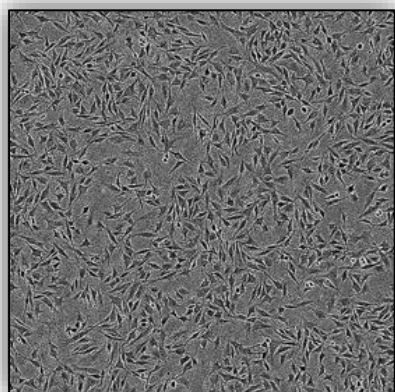
Para la cinética viral por inmunofluorescencia se realizó el protocolo que se describió en la determinación de la susceptibilidad y permisividad de la línea celular BHK-21 a partir de la fijación de los cultivos. El seguimiento se hizo a los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 horas posinfección (hpi).

8 RESULTADOS

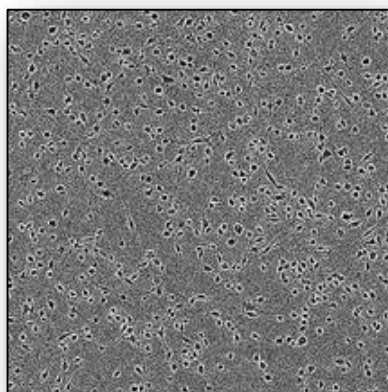
8.1 Replicación del virus de Zika

Se replicó la cepa ZIKV-Mex-2016 A en las líneas celulares C6/36 y BHK-21. Primero se realizó la propagación del virus en la línea celular C6/36. Como se observa en la **figura 13**, a partir de las 24 hpi se puede observar el efecto citopático, en comparación con las células no infectadas, las células infectadas presentan cambios en su morfología como la disminución del tamaño celular, las células comienzan a tener una forma redonda, a partir de las 72 hpi se observa que las células tienden a aglomerarse o formar grupos entre las células adyacentes y se comienza a observar una mayor muerte celular.

A. Células sin infección a las 72 h



B. Células a las 24 hpi



C. Células a las 72 hpi

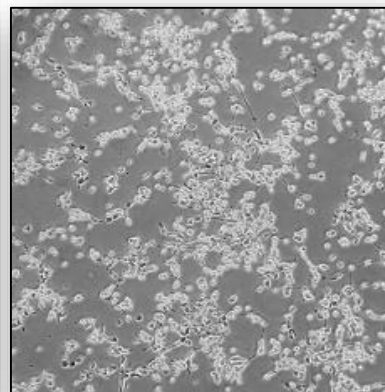
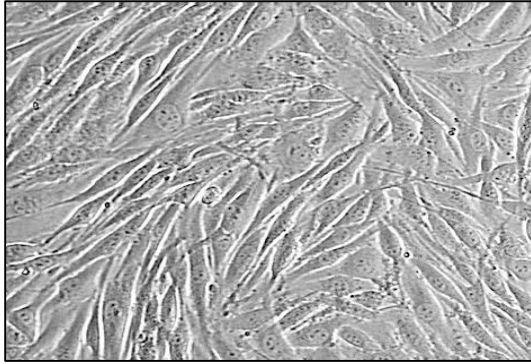


Figura 13. Propagación del virus de Zika en la línea celular C6/36. Control negativo observado a una confluencia del 80% a las 72 horas de crecimiento (A). Células infectadas con el virus de Zika (80% de confluencia; 60 μ l inóculo viral) a las 24 hpi (B). Células infectadas con el virus de Zika (80% de confluencia; 60 μ l inóculo viral) a las 72 hpi (C).

El sobrenadante se recolectó después de las 72 hpi y se utilizó para la replicación del virus de Zika en la línea celular BHK-21 como se muestra en la **figura 14**. A las 72 hpi se puede apreciar que la morfología celular cambia específicamente en el tamaño de las células, se observan células redondeadas y mayor muerte celular en comparación con las células no infectadas. El sobrenadante se recolectó y se almacenó en tubos de 1000 μ l a -70°C para su uso posterior.

A. Células sin infección a las 72 h



B. Células a las 72 hpi

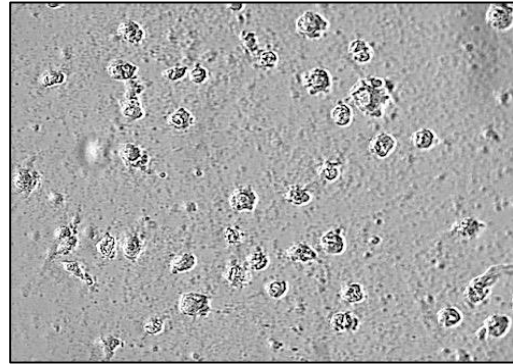


Figura 14. Replicación del virus de Zika en la línea celular BHK-21. Control no infectado observado a una confluencia del 80% a las 72 horas de crecimiento (A). Células infectadas con el virus de Zika (80% de confluencia; 60 µl inóculo viral) a las 72 hpi (B).

8.2 Titulación del virus de Zika

La titulación del virus de Zika se realizó a partir de ambos sobrenadantes de las líneas celulares C6/36 y BHK-21 infectados, 72 hpi, mediante el método de formación de placas líticas y para este procedimiento se utilizó la línea celular BHK-21. En ambos casos, se utilizaron diluciones seriadas (factor 10) que van desde 10^{-12} a 10^{-2} ; como observamos en la **figura 15**, para la línea celular C6/36 se obtuvo un título viral de 1.6×10^6 UFP/ ml, mientras que para la línea celular BHK-21 se obtuvo un título viral de 7.6×10^6 UFP/ml, como se observa en la **figura 16**.

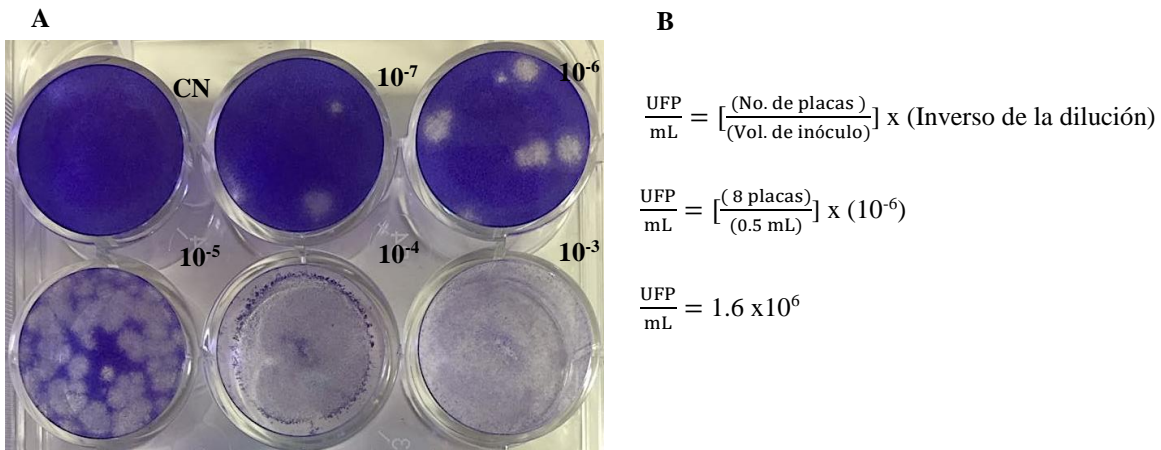


Figura 15. Titulación del virus de Zika en la línea celular BHK-21. Se muestra el resultado de la titulación del sobrenadante de las células C6/36 mediante el método de placas líticas. Se observa una placa de seis pozos con células BHK-21 fijadas y teñidas con cristal violeta, se muestra el control negativo y las diluciones seriadas del inóculo viral (10^{-3} – 10^{-7}) después de las 72 hpi (A). También se muestra la dilución que se utilizó, que fue 10^{-6} , además de que se observa la formula aplicada y las operaciones para realizar el cálculo del título viral (B).

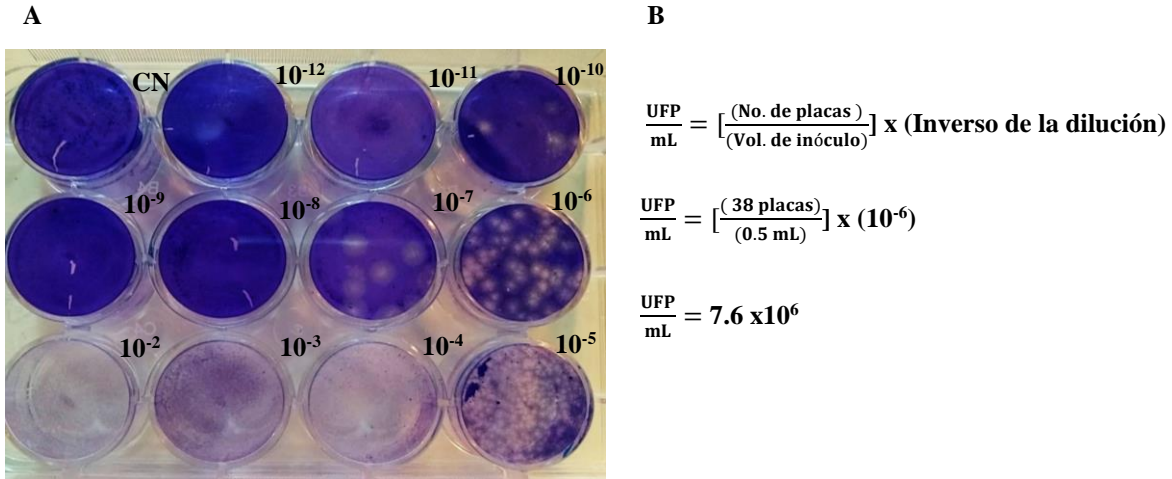


Figura 16. Titulación del virus de Zika en la línea celular BHK-21. Se muestra el resultado de la titulación del sobrenadante de las células BHK-21 mediante el método de placas líticas. Se observa células BHK-21 fijadas y teñidas con cristal violeta, se muestra el control negativo y las diluciones seriadas del inóculo viral (10^{-2} – 10^{-12}) después de las 72 hpi (A). También se muestra la dilución que se utilizó que fue 10^6 , además de que se observa la fórmula aplicada y las operaciones para realizar el cálculo del título viral (B).

8.3 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular BHK-21

Este trabajo de investigación está enfocado al estudio de la presencia de las proteínas de membrana celular de la familia de receptores de fosfatidilserina como TAM (Tyro-3 y Axl, principalmente) y TIM (TIM-1) y así poder entender la interacción que tienen durante la infección del virus de Zika y sus células dianas, que en nuestro caso fue la línea celular BHK-21. Además de observar en el microscopio el efecto citopático que provocó el virus de Zika en las células BHK-21, se realizó una inmunofluorescencia para detectar la susceptibilidad y permisividad de las células, mediante el uso de un anticuerpo que detecta principalmente moléculas de ARN de doble cadena, esto permitió identificar al virus de Zika durante su replicación en las células dianas que se utilizaron en el presente estudio.

En la **figura 17** podemos observar una secuencia de fotografías que corresponden a la infección del virus de Zika detectada mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, en la cual se realizaron diluciones seriadas (factor 10) que van desde 10^{-11} hasta 10^{-5} (**figura 17B- 17F**). Comparando con un control de células sin infección (**figura 17A**), se pudo detectar la infección viral en las células BHK-21 a las 24 hpi, mostrando que hay una mayor presencia viral, en color verde se muestran concentraciones virales mayores

(figura 17F, 157E y 15D), y al igual que en la figura 13, se apreció que las células tienden a modificar la forma del núcleo (núcleos se muestran de color azul), se observó aglomeración celular y también muerte celular que depende de la concentración viral después de la infección.

Este experimento nos permitió definir principalmente que la línea celular BHK-21 es un buen modelo de estudio para nuestros posteriores experimentos, aparte de que el método de inmunofluorescencia no solo permite identificar la presencia de los receptores sino también a cuantificar la infección viral y por lo tanto, se puede determinar si estos receptores están involucrados en la entrada del virus de Zika.

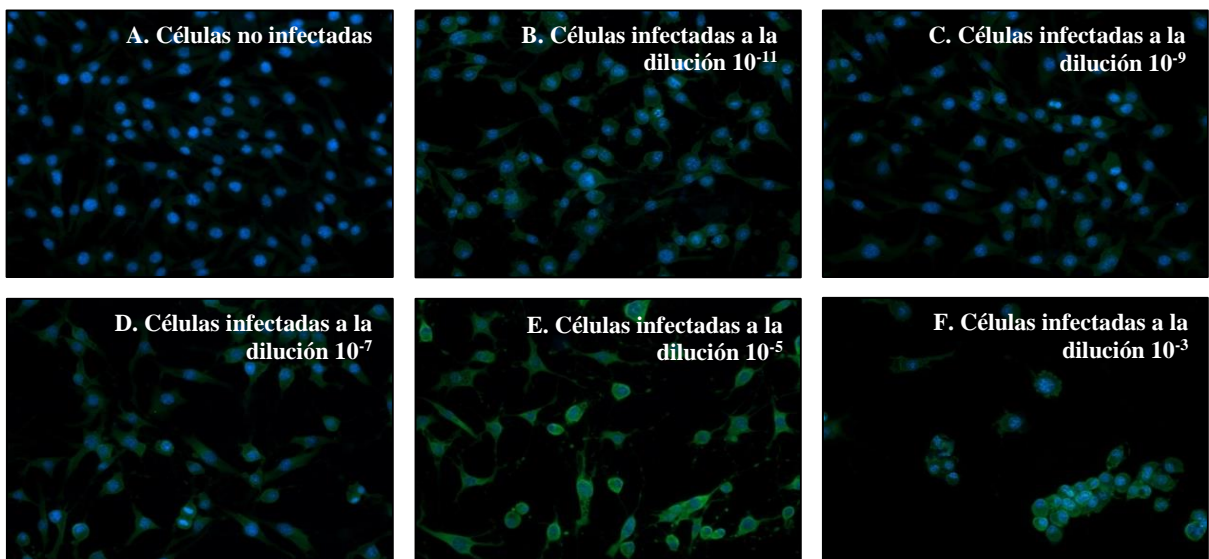


Figura 17. Identificación del virus de Zika. Se muestra la infección del virus de Zika en células BHK-21 la cual se detectó por inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpo específico para identificar la infección. Se tiene una población de células BHK-21 no infectadas, se observaron a las 24 h y las cuales son control negativo (A). Las células BHK-21 se infectaron con el virus de Zika a diferentes diluciones 10^{-11} (B), 10^{-9} (C), 10^{-7} (D), 10^{-5} (E), 10^{-3} (F), y fueron observadas a las 24 hpi, observando que en las de menor dilución viral hay una mayor coloración verde, que corresponde al anticuerpo secundario y en cada una de las diluciones se ve el cambio morfológico de las células comparando con el control negativo y de acuerdo a la dilución que se obtuvo. Los núcleos tanto de las células del control negativo y de las células infectadas a diferentes diluciones se tiñeron con Hoechst 1:1000

8.4 Identificación de los receptores en la línea celular BHK-21

Primero identificamos que la susceptibilidad y permisividad de las células BHK-21, sin embargo, fue necesario determinar, si estos parámetros estaban relacionados con la presencia de los receptores, por lo que el siguiente paso fue identificar la presencia de la

familia de las proteínas TAM (Tyro-3 y Axl) y TIM-1 en la línea celular BHK-21; esta identificación se realizó por inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpos primarios específicos, los cuales reconocen a cada uno de los receptores que son el objetivo de este estudio de investigación. Como se observa en la **figura 18**, se identificó la presencia de los tres receptores (Tyro-3, Axl y TIM-1) en las células BHK-21. Las proteínas que presentaron una mayor intensidad de fluorescencia fueron TIM-1 y Tyro-3 (**figura 18E y 18F**, respectivamente), mientras que Axl (**figura 18D**) se observa con una menor intensidad de fluorescencia, en comparación a las células control.

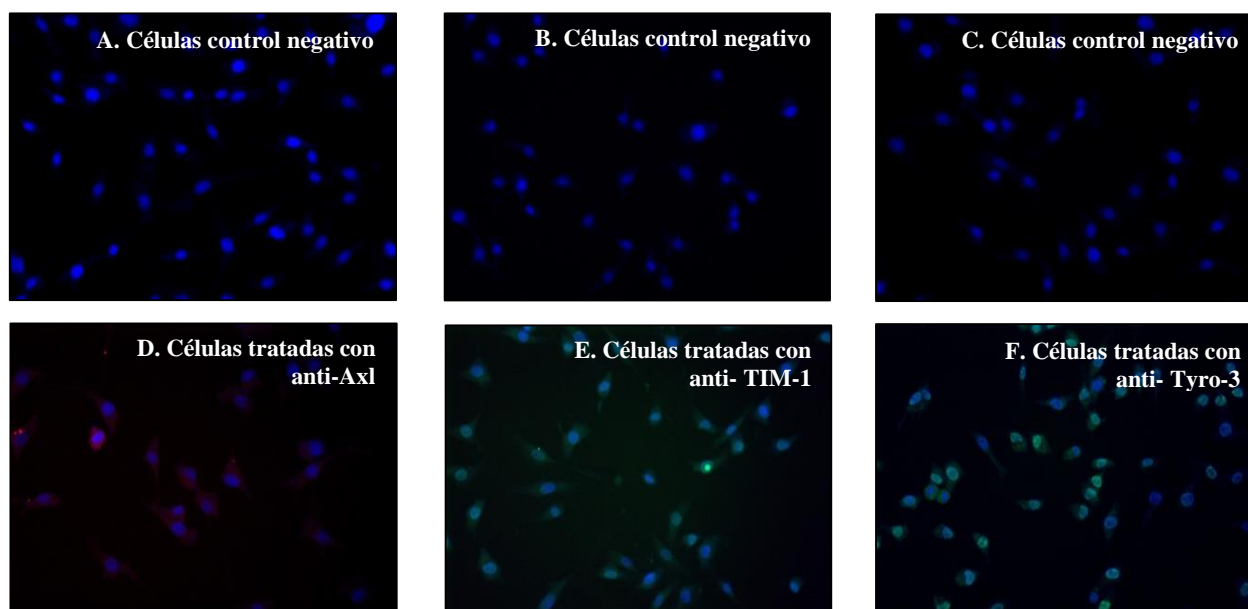


Figura 18. Identificación de las proteínas TAM y TIM. Se muestra la identificación de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3 en la línea celular BHK-21. Monocapas de células BHK-21 se incubaron con el anticuerpo secundario IgG de cabra acoplado con un fluorocromo rojo y a un IgG de ratón acoplado a un fluorocromo verde, correspondiendo al control negativo (A-C). Por otra parte, otra población de células BHK-21 dentro del mismo ensayo, se incubaron con los anticuerpos específicos para las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 respectivamente e inmunomarcadas con anticuerpos secundarios IgG de cabra acoplado a un fluorocromo rojo e IgG de ratón acoplado a un fluorocromo verde, respectivamente (D-F). En las diferentes condiciones los núcleos de las células fueron teñidas con Hoechst. Todas las condiciones fueron analizadas en un microscopio invertido equipado con epifluorescencia y observadas con el objetivo 20x. Las imágenes se analizaron en el programa Zen Blue 2.5.

Una vez que identificamos la presencia de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 en las células BHK-21, decidimos realizar la identificación de las mismas, pero en células infectadas con diferentes dosis del virus de Zika. Después del análisis, podemos reportar que los tres

receptores aumentan su señal cuando las células se infectan, tanto con dosis de 0.01 y 1 UFP/células, como se puede observar en la **figura 19**

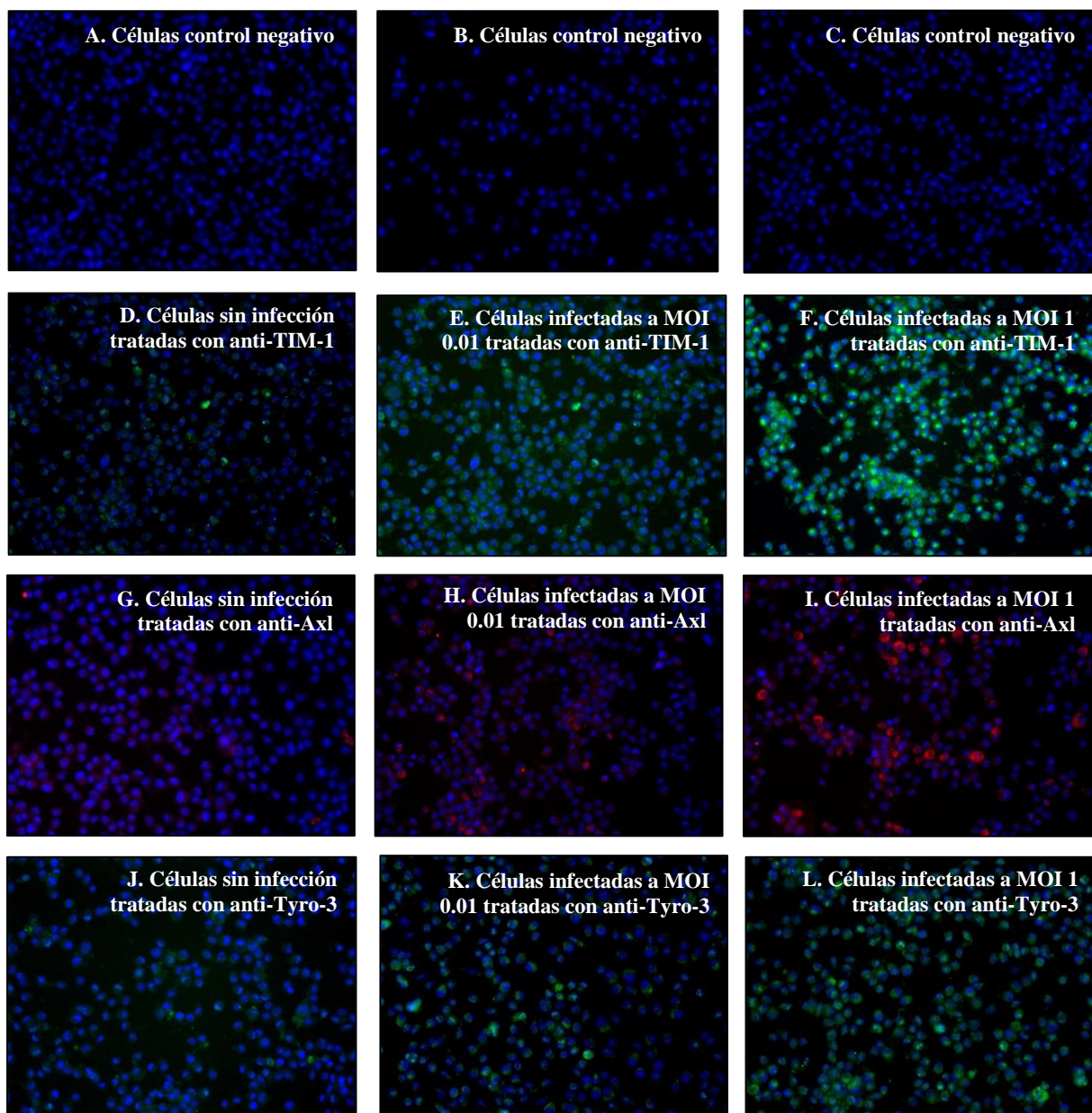


Figura 19. Identificación de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 durante la infección con el virus de Zika. Se muestran la identificación de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3 en la línea celular BHK-21 por inmunofluorescencia. Monocapas de células BHK-21 se incubaron con el anticuerpo secundario IgG de cabra acoplado con un fluorocromo rojo y a un IgG de ratón acoplado a un fluorocromo verde (A-C). Se muestran células BHK-21 no infectadas e infectadas a diferentes dosis virales (MOI de 0.01 y MOI de 1) e incubadas con el anticuerpo específico para la proteína TIM-1 e inmunomarcadas con el anticuerpo secundario IgG de ratón acoplado a un fluorocromo verde con el anticuerpo secundario IgG de cabra acoplado a un fluorocromo rojo (D-F). Se muestran células BHK-21 no infectadas e infectadas a diferentes dosis virales (MOI de 0.01 y MOI de 1) e incubadas con el anticuerpo específico para la proteína Axl e inmunomarcadas con el anticuerpo secundario IgG de cabra acoplado a un fluorocromo rojo (G-I). Se muestran células BHK-21 no infectadas e infectadas a diferentes dosis virales (MOI de 0.01 y MOI de 1) e incubadas con el anticuerpo específico para la proteína Tyro-3 e inmunomarcadas con el anticuerpo secundario IgG de ratón acoplado a un fluorocromo verde (J-L). En las diferentes condiciones los núcleos de las células fueron teñidas con Hoechst (1:1000). Todas las condiciones fueron analizadas en un microscopio invertido equipado con epifluorescencia y observadas con el objetivo 20x. Las imágenes fueron analizadas en el programa Zen Blue 2.5.

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía en el programa GraphPad Prism 8. Como se puede apreciar en la **figura 20**, la proteína TIM-1 tuvo diferencias significativas en ambas dosis virales cuando fueron comparadas con células sin infectar (**figura 20A**), por otra parte, Tyro-3 solo tuvo diferencias significativas a una MOI de 1 en comparación con las células sin infectar (**figura 20B**); y por último, el receptor Axl, no mostró en ninguna de las dos dosis virales diferencias significativas en comparación con las células sin infectar (**figura 20C**).

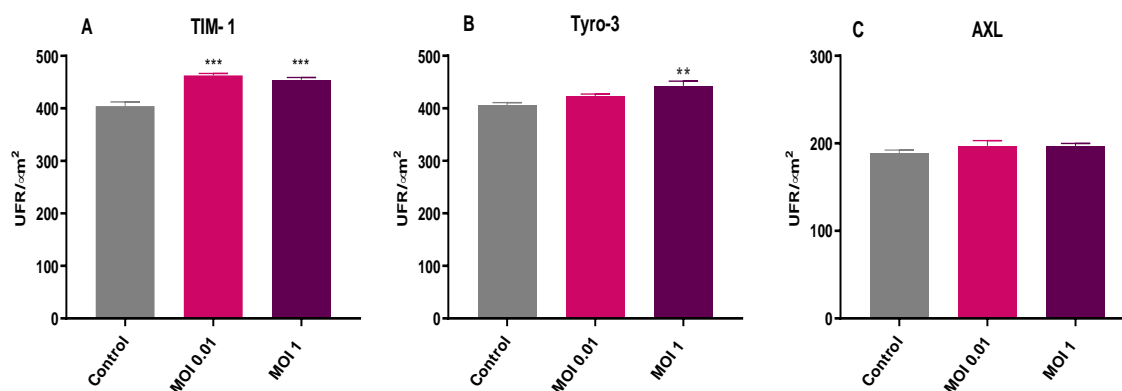


Figura 20. Identificación de las proteínas TIM-1, Axl y Tyro-3 en células infectadas con el virus de Zika. El receptor TIM-1 incrementa su señal en ambas dosis virales en comparación con las células control, MOI de 0.01, P= 0.0001 y MOI de 1, P= 0.0002 (A). El receptor Tyro-3 presenta una señal mayor a una MOI de 1, P= 0.0084 (B). El receptor Axl no presenta diferencias en su señal en ambas dosis virales. Para todos los datos se realizó una ANOVA de una vía y la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney para analizar las diferencias entre grupos de cada dato. Las barras de representan SEM) y se realizaron en el programa Prism 8, GraphPad.

8.5 Bloqueo de los probables receptores para el virus de Zika en la línea celular BHK-21

Hasta este punto observamos que la infección por el virus de Zika en las células BHK-21 aumenta señala presencia del de sus probables receptores sobre las células infectadas, pero no sabemos si esto se debe a que el virus usa a estas proteínas de membrana celular como principal receptor.

El principal objetivo de este trabajo de investigación es estudiar el papel de estas tres proteínas durante la infección del virus de Zika, por lo que, el siguiente experimento de esta

investigación fue incubar las células con anticuerpos específicos contra las proteínas TIM-1, Axl o Tyro-3 para después realizar el ensayo de infección con el virus de Zika. Esta serie de experimentos mostrará si la interacción de los anticuerpos específicos con cualquiera de las tres proteínas inhibe o bloquea su actividad como probable receptor para el virus en estas células.

La primera condición probada fue el bloqueo de estas tres proteínas de forma individual mediante anticuerpos específicos. Se evaluaron cinco tiempos después de la infección, desde las 0 hasta las 96 hpi. Como se muestra en la **figura 21**, cuando se infectó a una MOI de 0.1 se registró una disminución en la infección a 48 hpi, 72hpi y 96hpi, cuando se incubaron las células con anticuerpos específicos contra la proteína Axl (**figura 21A**) y la proteína TIM-1(**figura 21B**), sin embargo, se muestra una mayor diferencia significativa a las 72 hpi en ambos casos, comparándolas con las células infectadas sin tratamiento con anticuerpo. Para el receptor Tyro-3 (**figura 21C**), a la MOI de 0.1, la disminución de la infección a las 72 hpi es mínima, no solo comparándola con las células infectadas sin presencia de anti-Tyro-3, sino que también con respecto a las células que fueron incubadas con anti-Axl y anti-TIM-1, respectivamente.

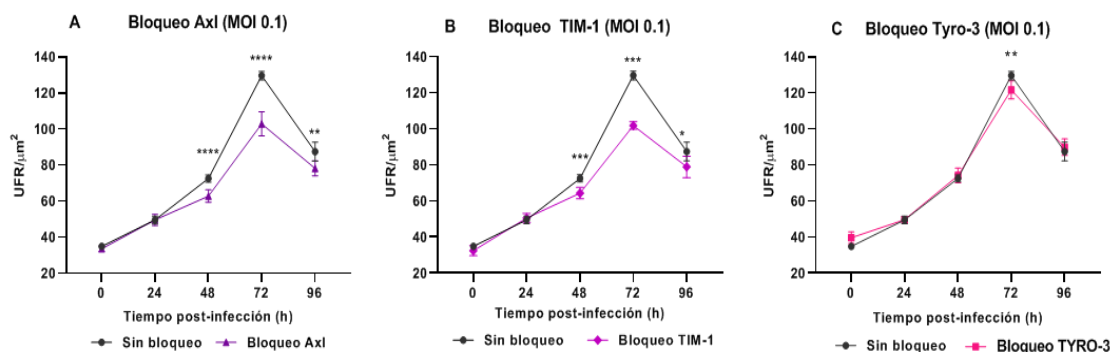


Figura 21. Bloqueo de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 y su efecto en la infección del virus de Zika a MOI de 0.1. La incubación del anticuerpo específico contra Axl disminuye la infección viral a la MOI de 0.1 en tres tiempos después de la infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 48 hpi ($p=0.0001$), 72 hpi ($p=0.0001$) y 96 hpi ($p=0.0038$) (A). La incubación del anticuerpo específico contra TIM-1 disminuye la infección viral a la MOI de 0.1 en tres tiempos después de la infección en comparación con las células infectadas sin ningún bloqueo, a 48hpi ($p=0.0001$), 72 hpi ($p=0.0001$) y 96hpi ($p=0.0257$) (B). La incubación del anticuerpo específico contra Tyro-3, presenta diferencias significativas con respecto a las células infectadas sin bloqueo en un solo tiempo después de la infección, 72hpi ($p=0.0056$). Para todos los datos se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni en el programa GraphPad Prism 8. Las diferencias significativas entre cada condición y el control se muestran en asteriscos, los cuales indican los valores de p . Los datos que se muestran corresponden de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Por otra parte, como se observa en la **figura 22**, encontramos que cuando se infectó a una MOI de 1, el anticuerpo contra Axl (**figura 22A**), disminuyó la infección en tres tiempos postinfección de manera significativa en comparación con las células infectadas sin bloqueo. Para el bloqueo del receptor TIM-1 (**figura 22B**) a la misma dosis viral, observamos que la infección disminuyó en cuatro tiempos postinfección lo que mostró diferencias significativas en comparación con las células infectadas sin bloqueo. Por último, en el bloqueo del receptor Tyro-3 (**figura 22C**) a la misma dosis viral, se observó que solo disminuyó la infección viral en dos tiempos postinfección mostrando diferencias significativas en comparación con las células infectadas sin bloqueo. Es importante resaltar, que en las tres condiciones de bloqueo se observó una mayor disminución de la infección viral y una mayor diferencia significativa a las 72 hpi, siendo el tiempo más representativo en este análisis de datos.

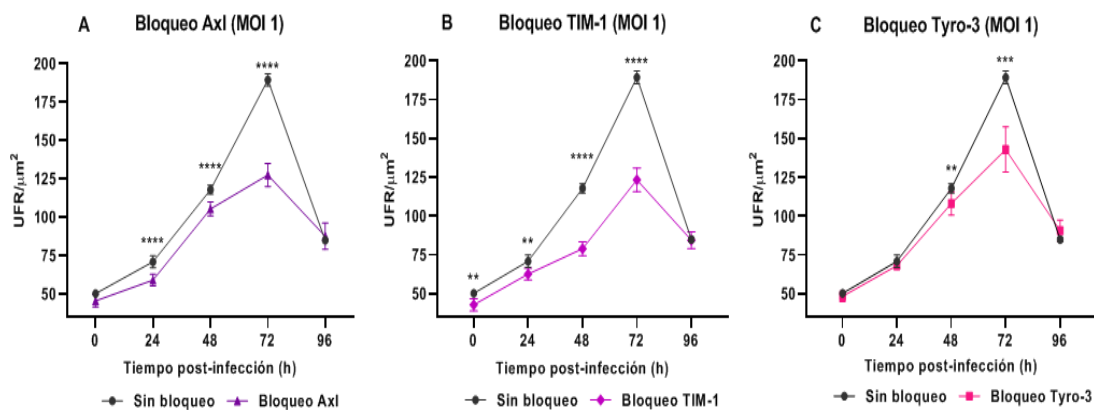


Figura 22. Bloqueo de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 en células infectadas con el virus de Zika a MOI de 1. La incubación del anticuerpo específico contra Axl disminuye la infección viral a la MOI de 1 en tres tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 24hpi ($p=0.0001$), 48hpi ($p=0.0001$) y 72hpi ($p=0.0001$) (A). La incubación del anticuerpo específico contra TIM-1 disminuye la infección viral a la MOI de 1 en cuatro tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin ningún bloqueo, 0hpi ($p=0.0018$), 24hpi ($p=0.0019$), 48hpi ($p=0.0001$) y 72hpi ($p=0.0001$) (B). La incubación del anticuerpo específico contra Tyro-3 disminuye la infección viral a la MOI de 1 en dos tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 48hpi ($p=0.0059$) y 72hpi ($p=0.0001$). Para todos los datos se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni en el programa GraphPad Prism 8. Las diferencias significativas entre cada condición y el control se muestran en asteriscos, los cuales indican los valores de p . Los datos que se muestran corresponden de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Si bien, en estos resultados observamos que al bloquear los receptores, principalmente Axl y TIM para ambas dosis virales, se mostraba un efecto sobre la infección por el virus de Zika, la siguiente pregunta fue ¿Qué efecto tendría si hay una combinación de anticuerpos? o en otras palabras ¿Qué efecto hay sobre la infección, cuando se bloquean dos o tres receptores a la vez?; por lo que el siguiente experimento que se realizó fue el combinar dos o tres anticuerpos para realizar el bloqueo de estos mismos receptores diana a la vez y así evaluar el efecto que hay sobre la infección viral comparando con células infectadas con el virus de Zika sin ningún bloqueo de receptores.

Se realizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos para el bloqueo de los receptores, los cuales se usaron para ambas dosis virales: Axl-TIM-1, Axl-Tyro-3, Tyro-3-TIM-1 y Axl-TIM-1-Tyro-3. Los resultados para la MOI de 0.1 se muestran en la **figura 23**, la mayoría de las combinaciones del bloqueo de los receptores tuvieron un efecto sobre la infección por el virus de Zika, observando que la infección viral disminuye gracias al bloqueo de dos o tres receptores, los cuales presentan una diferencia significativa en cinco tiempos postinfección (**figura 23A**, **figura 23B**, **figura 23C**), exceptuando la combinación del bloqueo de Axl-Tyro-3 (**figura 23D**) ya que este solo presenta diferencias significativas para 3 tiempos postinfección.

En el caso de la MOI de 1, los resultados se muestran en la **figura 24**, observamos que el que tuvo un mayor efecto sobre la infección del virus de Zika fue el bloqueo de los receptores Axl-TIM-1(**figura 24A**), la disminución de la infección viral se observó a partir de 0 hpi hasta 96 hpi, puesto que presentaron diferencias significativas en estos puntos en comparación con las células infectadas sin bloqueo. Para el bloqueo de Axl-Tyro-3 (**figura 24B**) y el bloqueo de Axl-TIM-1 y Tyro-3 (**figura 24D**) presentaron diferencias significativas y disminución en la infección en 4 y 5 tiempos postinfección respectivamente, en comparación con las células infectadas sin bloqueo. Por último, observamos que para el bloqueo de Tyro-3-TIM-1 (**figura 24C**) solo presentó diferencias significativas y disminución de la infección viral en dos tiempos postinfección.

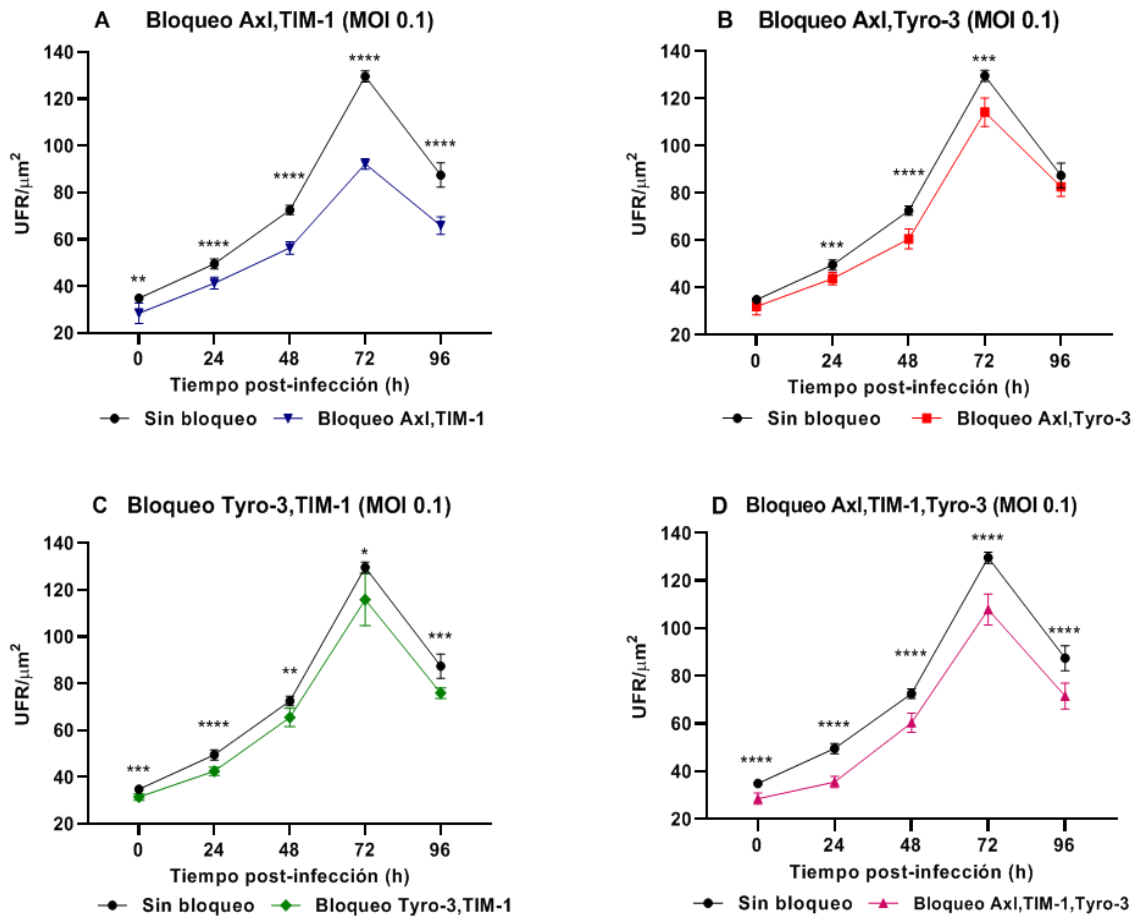


Figura 23. Bloqueo de dos o tres receptores en células infectadas con el virus de Zika a MOI de 0.1 de manera simultánea. Se muestra el bloqueo de más de un receptor, que corresponden a la combinación de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3. El bloqueo de Axl/TIM-1 disminuye la infección viral a la MOI de 0.1 en los 5 tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 0hpi $p=0.0097$, 24hpi $p=0.0001$, 48hpi $p=0.0001$, 72hpi $p=0.0001$, 96hpi $p=0.0001$ (A). El bloqueo de Axl/Tyro-3 disminuye la infección viral a la MOI de 0.1 en tres tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin ningún bloqueo, 24hpi $p=0.0006$, 48hpi $p=0.0001$ y 72hpi $p=0.0001$ (B). El bloqueo de Tyro-3/TIM-1 disminuye la infección viral a la MOI de 0.1 en cinco tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 0hpi $p=0.0002$, 24hpi $p=0.0001$, 48hpi $p=0.0021$, 72hpi $p=0.0291$ y 96hpi $p=0.0004$ (C). El bloqueo de Axl/TIM-1/Tyro-3 disminuye la infección viral a la MOI de 0.1 en 5 tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 0hpi $p=0.0001$, 24hpi $p=0.0001$, 48hpi $p=0.0001$, 72hpi $p=0.0001$ y 96hpi $p=0.0001$ (D). Para todos los datos se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni en el programa GraphPad Prism 8. Las diferencias significativas entre cada condición y el control se muestran en asteriscos, los cuales indican los valores de p . Los datos que se muestran corresponden de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

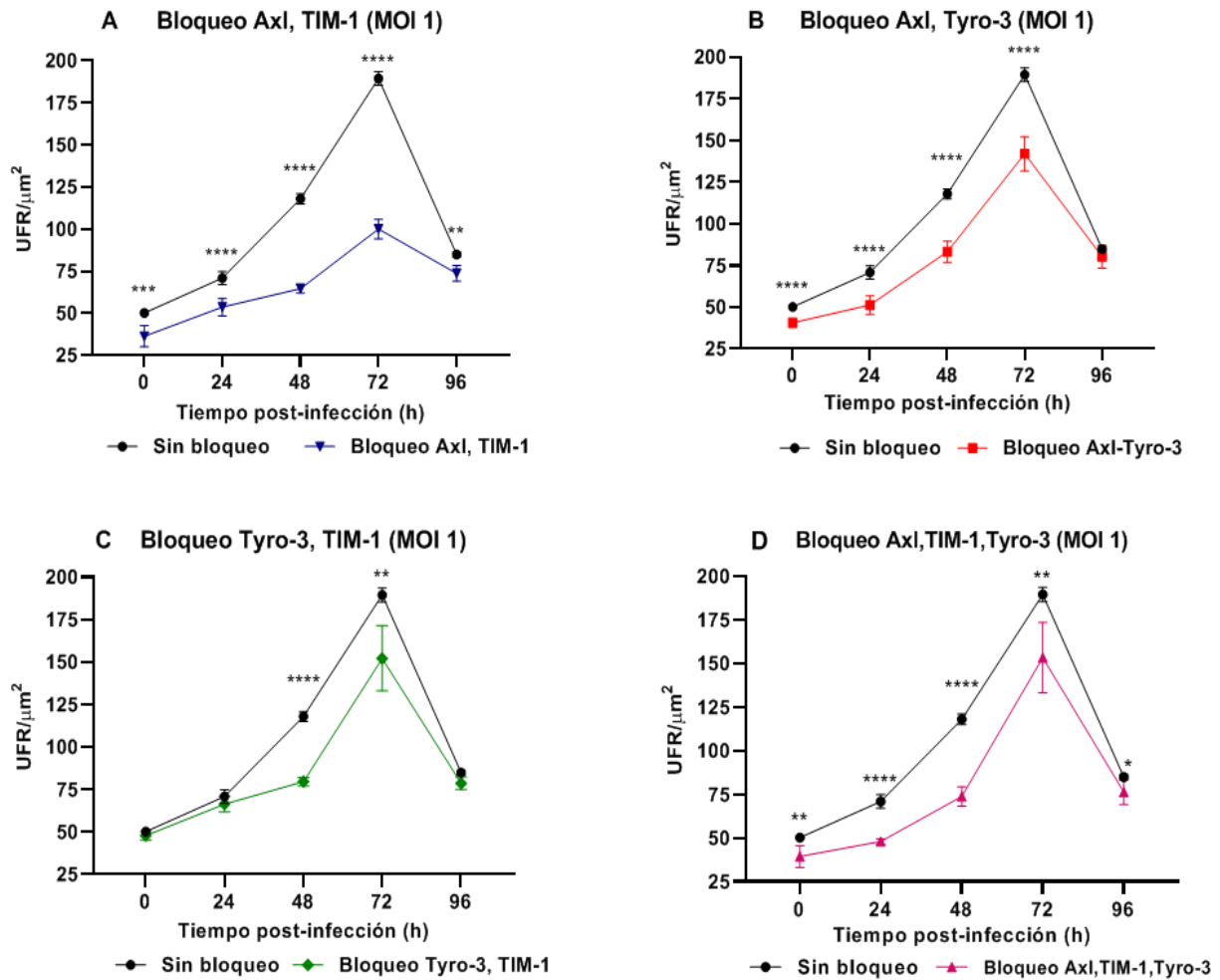


Figura 24. Bloqueo de dos o tres receptores en células infectadas con el virus de Zika a MOI de 1. Se muestra el bloqueo de más de un receptor, que corresponden a la combinación de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3. El bloqueo de Axl/TIM-1 disminuye la infección viral a la MOI de 1 en los 5 tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 0hpi $p=0.0006$, 24hpi $p=0.0001$, 48hpi $p=0.0001$, 72hpi $p=0.0001$, 96hpi $p=0.0071$ (A). El bloqueo de Axl/Tyro-3 disminuye la infección viral a la MOI de 1 en cuatro tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin ningún bloqueo, 0hpi $p=0.0001$, 24hpi $p=0.0001$, 48hpi $p=0.0001$ y 72hpi $p=0.0001$ (B). El bloqueo de Tyro-3/TIM-1 disminuye la infección viral a la MOI de 1 en dos tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 48hpi $p=0.0001$ y 72hpi $p=0.0016$ (C). El bloqueo de Axl/TIM-1/Tyro-3 disminuye la infección viral a la MOI de 0.1 en 5 tiempos post-infección en comparación con las células infectadas sin bloqueo, 0hpi $p=0.0031$, 24hpi $p=0.0001$, 48hpi $p=0.0001$, 72hpi $p=0.0030$ y 96hpi $p=0.0322$. Para todos los datos se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni en el programa GraphPad Prism 8. Las diferencias significativas entre cada condición y el control se muestran en asteriscos, los cuales indican los valores de p . Los datos que se muestran corresponden de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

En la mayoría de las condiciones, es decir, el bloqueo de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3 de forma individual o bien la combinación se observó en las gráficas, al hacer el análisis estadístico, se determinó que hubo diferencias significativas en la disminución de la infección viral, la cual, de manera general fue mayor a las 72 hpi. El cálculo de los porcentajes de reducción de la infección se muestra en la **tabla 3**.

Para todos los bloqueos que se realizaron en ambas dosis virales, a partir de las células BHK-21 infectadas las cuales no fueron tratadas con ningún anticuerpo específico para poder bloquear los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3, se tomaron como células control para poder compararlas con respecto a células BHK-21 tratadas con uno de los anticuerpos específicos para bloquear los receptores ya mencionados. El promedio de las células control que se obtuvo a las 72 hpi, fue considerado como el 100% de infección para calcular los porcentajes correspondientes a la infección en células tratadas con anticuerpos para el bloqueo del receptor del mismo tiempo postinfección.

En el ensayo de bloqueo del receptor Axl con infección a la MOI de 0.1, la infección se redujo a 79%, mientras que a la MOI de 1 fue de 67% respecto al control sin anticuerpo. En el caso del ensayo de bloqueo del receptor TIM-1 a la MOI de 0.1, la infección disminuyó al 79% y a la MOI de 1, la infección fue de 65%, respecto al control sin anticuerpo. Por último, en el caso de Tyro-3, a la MOI de 0.1 la infección se redujo marginalmente, llegando solamente a 94% de infección, sin embargo, a la MOI de 1 la infección llegó a abajo hasta el 75%. Estos resultados se muestran en la **tabla 3**.

Tabla 3. Infección del virus de Zika en células tratadas con anticuerpos anti-Axl, anti-TIM-1 y anti-Tyro-3. Se muestra el porcentaje de infección promedio a 72 pi y la disminución de la infección en células BHK-21 en dos dosis virales (MOI de 0.1 y MOI de 1) previamente tratadas con anticuerpos específicos contra Axl, TIM-1 y Tyro-3 de forma individual.

Anticuerpo	Porcentaje de la Infección	Disminución de la infección en porcentaje
MOI 0.1		
Sin anticuerpo	100%	0%
Anti-Axl	79%	21%
Anti-TIM-1	79%	21%
Anti-Tyro-3	94%	6%
MOI 1		
Sin anticuerpo	100%	0%
Anti- Axl	67%	33%
Anti-TIM-1	65%	35%
Anti-Tyro-3	75%	25%

Cuando las células BHK-21 se trataron con dos o tres anticuerpos para bloquear más de un receptor a la vez previo a la infección, se observó lo siguiente: los anticuerpos contra Axl/ TIM-1 a la MOI de 0.1 tuvo una infección del 75%, mientras que, para la MOI de 1 la infección fue del 53%.; de los ensayos con anticuerpos contra Axl/ Tyro-3 a la MOI de 0.1 y MOI de 1 se determinaron niveles de infección del 80% y 75%, respectivamente. Por otra parte, para el bloqueo de Tyro-3/ TIM-1, observamos que para ambas dosis virales se obtuvo aproximadamente el 80% de infección disminuyendo aproximadamente solo del 10 al 20% de la infección viral. Por último, cuando las células se pre incubaron con anticuerpos contra las tres proteínas, se determinó que ambas dosis virales la infección se redujo a niveles de 81 y 83%. Estos resultados se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Bloqueo de dos o tres receptores en células BHK-21 infectadas con el virus de Zika. Se muestra el porcentaje de los promedios del tiempo 72hpi que corresponde a la infección y a la disminución de la infección en células BHK-21 en dos dosis virales (MOI de 0.1 y MOI de 1) previamente tratadas con dos o tres anticuerpos para el bloqueo de los receptores Axl, TIM-1 y Tyro-3 de forma individual.

Anticuerpo	Porcentaje de la Infección	Disminución de la infección en porcentaje
MOI 0.1		
Sin Anticuerpo	100%	0%
Anti- Axl/ TIM-1	75%	25%
Anti- Axl/ Tyro-3	88%	12%
Anti-Tyro-3/ TIM-1	89%	11%
Anti-Axl/ TIM-1/ Tyro-3	83%	17%
MOI 1		
Sin Anticuerpo	100%	0%
Anti- Axl/ TIM-1	53%	47%
Anti- Axl/ Tyro-3	75%	25%
Anti- Tyro-3/ TIM-1	80%	20%
Anti- Axl/ TIM-1/ Tyro-3	81%	19%

Después de hacer el análisis de los resultados previamente presentados en las gráficas y tablas, se determinó que el efecto que hubo sobre la infección del virus de Zika en células BHK-21 bloqueadas con uno, dos o tres receptores, fue mayoritariamente en aquellas células BHK-21 que fueron tratadas con los anticuerpos Axl y TIM-1, ya sea de forma individual o en combinación entre ellos; mostrando una mayor frecuencia de diferencias significativas, las cuales son las que se observaron con un efecto sobre la infección a partir de las 0 hpi hasta las 96 hpi, esto quiere decir que el bloqueo de cualquiera de los dos receptores tiene un efecto en la disminución de la infección viral, sin embargo, para el receptor Tyro-3, las diferencias significativas fueron menores, teniendo un menor efecto en la disminución de la infección viral.

9. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, el virus de Zika es un arbovirus emergente, que se transmite principalmente por la picadura de mosquitos del género *Aedes*, sin embargo, a partir de los brotes en América en 2015- 2016, principalmente en Brasil, se observaron secuelas clínicas graves convirtiendo a la infección por el virus de Zika en una emergencia de salud pública con interés internacional, debido a que hubo un aumento dramático de casos de microcefalia y síndrome de Guillain- Barré que fueron relacionados con el virus y que fueron reportados principalmente en regiones donde el virus de Zika es endémico ¹⁶⁷.

Es importante realizar la estandarización de un modelo experimental para realizar estudios sobre la infección por el virus de Zika, ya que es de suma importancia estudiar el mecanismo de infección o los mecanismos que el virus de Zika infecta una amplia gama de tipos celulares. Se ha reportado de que el virus de Zika puede ser propagado fácilmente en líneas celulares de mamífero, como VERO, BHK-21 y LLC-MK2, al igual que en líneas celulares que son derivadas de células de mosquitos como C6/36, las cuales fueron utilizadas dentro de este proyecto para la propagación viral ¹⁶⁸.

Los sobrenadantes se recolectaron de las 24 a las 72 hpi, ya que, a partir de las 24 hpi se observaron cambios morfológicos en las células; como ya se mencionó, las células adquirieron una forma redondeada o circular y a las 72 hpi se observó principalmente desprendimiento y una mayor muerte celular.

Estudios aplicados para la investigación en el campo de la virología utilizan con gran frecuencia el ensayo de las placas líticas debido a que es el “estándar de oro” que permite cuantificar o determinar la cantidad de virus infeccioso que se encuentra en una muestra, principalmente de sobrenadantes también es ampliamente usado el método de inmunofluorescencia y fue el que usamos para la determinación de los títulos virales mediante la determinación de focos fluorescentes y hacer una cinética de replicación viral. Para la identificación del virus en las células utilizamos un anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón que identifica ARN de doble cadena, intermediario replicativo de virus con genoma de

sentido positivo, en un segmento de más de 40 pares de bases de longitud, esto significa que permite identificar las células en las que el virus de Zika se está replicando ^{169,170}.

Se realizó la estandarización de este método en nuestro modelo de estudio, que es la línea celular BHK-21, estas células se infectaron con el virus de Zika en cinco diferentes diluciones (factor 10) y se observaron a las 24 hpi. La marca del anticuerpo anti dsRNA se observó en el citoplasma de las células infectadas. En diluciones menores, con mayor concentración viral, la señal emitida o coloración verde fue de mayor intensidad en comparación de aquellas diluciones mayores con menor concentración viral, sin embargo, en ambos casos se pudieron observar las diferencias morfológicas de cada uno, mostrando muerte celular que es causada por la infección viral. ¹⁷¹.

El objetivo principal de nuestro proyecto fue determinar algunos aspectos de cómo el virus de Zika ingresa en las células BHK-21, ya que es de suma importancia comprender los mecanismos de infección para el virus de Zika, pues hasta el momento tenemos conocimiento de que diferentes tipos de células, así como de tejidos, permiten la entrada, replicación y salida del virus de Zika. En trabajos de Hamel et al., 2015, Meertens et al., 2012 y Perera-Lecoin., 2013 ^{84,115,153}, transfectaron las proteínas Axl, Tyro-3 y TIM-1 en células originalmente no permisivas demostraron que estas proteínas tienen un papel relevante para la infección. En este trabajo lo que propusimos fue demostrar que las células BHK-21 son susceptibles a la infección por la presencia de estas proteínas y que su bloqueo por medio de anticuerpos reduce la infección.

Como primera parte, se realizó la identificación de las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3 en las células BHK-21 mediante inmunofluorescencia. Se observó con mayor intensidad de fluorescencia a la proteína TIM-1, seguido de la proteína Tyro-3, y en menor intensidad a la proteína Axl. Los siguientes ensayos muestran que la infección de las células probablemente estimula la presencia de estas proteínas en la superficie celular, lo cual se muestra como el aumento de la señal fluorescente para cada una de las proteínas analizadas. Se observó que el mayor incremento de la señal fue para la proteína TIM-1 con la infección en ambas dosis virales, mientras que para la proteína Tyro-3 solo se observó el incremento a

la MOI de 1, sin embargo, la proteína Axl no experimentó cambios en su nivel de expresión en las células infectadas; es importante mencionar que el incremento de la señal solo se evaluó a las 24hpi. El incremento de la señal puede ser por dos razones, la primera es que la intensidad de fluorescencia que se observa puede estar relacionada con la cantidad de proteína que se encuentra en las células BHK-21, esto quiere decir que, probablemente la infección causa una estimulación para aumentar la expresión, tanto de TIM-1 como de Tyro-3. La segunda razón, si bien no se realizaron experimentos con respecto a la definición del papel de la PtdSer durante la interacción de estas proteínas y su papel como receptores para la entrada del virus de Zika y la inclusión de este fosfolípido en la envoltura viral del virus, ya que en estudios como de Meertens et al., 2012 y Morizono and Chen.,2014^{150,153,160}, han identificado a este fosfolípido en la envoltura viral, principalmente en virus con envoltura como el virus del dengue, virus del ébola, VIH, entre otros virus, y que debido a este fosfolípido, la familia de los receptores como TAM y TIM reconocen al virus y permiten su entrada a la célula huésped, ya que en ausencia de este mismo se ve una disminución de la infección viral, por lo que se considera que este incremento de emisión de la señal, podría relacionarse con la inclusión de la PtdSer en la envoltura viral del virus de Zika y que al ser reconocido o al interactuar con las proteínas TIM-1 y Tyro-3, provocando un incremento de la señal del receptor cuando las células están infectadas en comparación con las células no infectadas, y como se mencionó anteriormente, al incluir a este fosfolípido en su envoltura ayuda a promover una mayor eficacia y eficiencia para la infección en células diana, ya que en los experimentos del bloqueo de los receptores ya sea individual o en combinación, la disminución de la infección fue con mayor frecuencia con la proteína Axl y al correlacionar nuestros datos con los antecedentes podemos suponer que este incremento y con el aumento de la señal de las proteínas TIM-1 y Tyro-3 se relaciona con que ambas proteínas son quienes realizan la primera interacción con el virus y posteriormente la proteína Axl es quien realiza la entrada del virus a la célula huésped, como se observó en el trabajo de Hamel et al., 2015¹¹⁵, sin embargo, podemos dejarlo como una perspectiva para evaluar el papel de la PtdSer en las células BHK-21 y considerar otras proteínas como posibles receptores para la entrada del virus de Zika.

Debido a estudios realizados en otros flavivirus, se ha podido describir una gran variedad de probables receptores y factores de entrada, principalmente para el virus del dengue. Estos antecedentes se tomaron en cuenta para poder dar inicio al estudio de los principales factores de adhesión a la superficie o la membrana capaces de actuar como factores principales para la entrada del virus de Zika en una amplia gama de tejidos y células; entre los factores descritos que han sido de mayor impacto están las moléculas DC-SIGN, Axl, Tyro-3 y en menor medida TIM-1 ¹¹⁵. Para este trabajo, se consideró el mecanismo de entrada del virus de Zika mediante su interacción con los receptores de fosfatidilserina, debido a que la principal función de ambas familias de proteínas de membrana celular es la absorción fagocítica que depende de la fosfatidilserina y la eliminación de células apoptóticas, pero que a su vez se ha visto que estos receptores participan como factores de entrada de virus envueltos entre ellos el virus del dengue, como en el trabajo de Meertens et al.,2012 ¹⁵³, por lo que se han considerado como principales factores de entrada para el virus de Zika, lo que nos lleva a nuestro tercer objetivo, que fue determinar si los receptores Axl, Tyro-3 y TIM-1 están involucrados en la entrada del virus de Zika en la células BHK-21.

Nuestros resultados, mostraron la presencia de estas tres proteínas en las células BHK-21 son importantes para la infección por el virus de Zika. Esto se demostró al realizar un bloqueo de estas proteínas mediante el uso de anticuerpos contra los receptores de manera individual. Se observó disminución en diferentes grados de la infección, principalmente cuando se bloquearon las proteínas Axl y TIM-1 y, en menor medida la proteína Tyro-3, lo cual indica que, aunque pueden ser importantes de manera individual, la ausencia de una de las proteínas puede ser sustituida por otra. Por otra parte, cuando se realizó el bloqueo por combinación o conjunto de anticuerpos, se observó que el de mayor efecto sobre la disminución de la infección viral fue producido por la combinación de Axl/TIM-1, seguido de la combinación de Axl/Tyro-3 y por último la combinación Axl/TIM-1/Tyro-3; estos resultados nos sugieren en primer lugar que los receptores mayoritariamente Axl y TIM-1, y en menor cantidad el receptor Tyro-3 son factores de la membrana celular que intervienen en la unión entre el virus de Zika y la infección viral, además encontramos que la administración en conjunto de los anticuerpos Axl/TIM-1 tiene un mayor efecto en la disminución o es decir, hay una mayor inhibición de la infección que es casi del 50% y en correlación con nuestros

resultados en el incremento de la señal de TIM-1 por la infección por el virus de Zika, nos lleva a la posible idea de que TIM-1 podría tener un papel de coreceptor, esto quiere decir que cumpla la función como un factor de unión para poder establecer en primera instancia, el reconocimiento de la partícula viral y ser un tipo de puente para poder transferir a este virión a otro receptor que realice la función de internalizar al virus en la célula hospedera, que en este caso podríamos considerar a la proteína Axl, si bien esto ya se ha reportado, en estudios de Kondratowicz et al., 2011, Morizono y Chen.,2014 y Wang et al., 2017 principalmente para el virus del dengue, no es lejano considerarlo para el virus de Zika^{153,160,172,173}.

En contraste con lo anterior, el hecho de que haya una mayor disminución o inhibición de la infección viral cuando está presente o se administra el anticuerpo anti-Axl, debemos considerarlo en primer lugar como el receptor con mayor importancia e impacto para la entrada del virus de Zika en las células BHK-21, a pesar de que se ha visto que en modelos de estudio en ratones, los receptores TAM no son necesarios para la infección por el virus de Zika, trabajos como los de Begum et al., 2019, Hastings et al., 2017 y Meertens et al., 2012, demostraron que Axl es un receptor primario principalmente para la entrada de flavivirus y otros virus envueltos, no solamente en diferentes modelos de estudio sino en algunas células con importancia tisular. De igual modo, considerando la participación de Axl con TIM-1, se ha reportado hasta el momento que los miembros de la familia TAM en general, son capaces de interactuar y unirse a receptores no pertenecientes a su familia, mediante una dimerización, esto quiere decir, que Axl podría reclutar moléculas como TIM-1 para poder formar un complejo para permitir la entrada viral, sin embargo, esto ha sido considerado en virus del dengue, por lo que aún nos faltarían más experimentos para poder correlacionar estos resultados y poder comprobar que Axl reclute en este modelo de estudio a la molécula TIM-1 como una molécula cooperadora para la entrada del virus de Zika en células BHK-21 y posiblemente en otras células blanco para el virus^{145,153,157,174}.

10. CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman que los receptores TIM-1, Tyro-3 y Axl están presentes en la línea celular BHK-21. Por otra parte, cuando las células son infectadas con el virus de Zika, la presencia de las proteínas TIM-1 y Tyro-3 se incrementa en comparación con las células no infectadas, algo que parece no ocurrir con la proteína Axl. Esto sugiere que las proteínas TIM-1, mayoritariamente y Tyro-3 son estimulados por la infección por el virus de Zika en la línea celular BHK-21.

Mediante el uso de anticuerpos específicos contra las proteínas Axl, TIM-1 y Tyro-3, ya sea con la administración de un anticuerpo, específicamente Axl y TIM-1, o la combinación de dos anticuerpos, Axl/TIM-1 y Axl/Tyro-3, se observó una disminución de la infección del virus de Zika en las células BHK-21, lo que nos lleva a la conclusión de que la entrada del virus está mediada principalmente por el receptor Axl pero con participación del receptor TIM-1, el cual podría estar llevando la interacción entre el virión y la célula blanco para posteriormente facilitar su entrada con el receptor Axl. Sin embargo, en ningún caso, el bloqueo de las proteínas por medio de anticuerpos eliminó la infección de manera completa, por lo que es posible que haya más moléculas que podrían funcionar como receptores para el virus, además de las tres proteínas de superficie estudiadas en este proyecto.

11. REFERENCIAS

1. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):487-524. doi:10.1128/CMR.00072-15
2. PAHO | Zika virus infection. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=427&Itemid=41484&lang=en. Accessed June 19, 2019.
3. da Silva S, Oliveira Silva Martins D, Jardim A, Da Silva S, Oliveira Silva Martins D, Jardim ACG. A Review of the Ongoing Research on Zika Virus Treatment. *Viruses.* 2018;10(5):255. doi:10.3390/v10050255
4. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. Olson KE, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1477. doi:10.1371/journal.pntd.0001477
5. Hayes EB. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1347. doi:10.3201/EID1509.090442
6. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2536-2543. doi:10.1056/NEJMoa0805715
7. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau V-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):O595-O596. doi:10.1111/1469-0691.12707
8. Oehler E, Watrin L, Larre P, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance.* 2014;19(9):20720. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720
9. Song B-H, Yun S-I, Woolley M, Lee Y-M. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol.* 2017;308:50-64. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.03.001
10. Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(4):569-572. doi:10.1590/0074-02760150192
11. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(3):59-62. doi:10.15585/mmwr.mm6503e2
12. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet.*

- 2016;387(10033):2125-2132. doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6
13. Enfissi A, Codrington J, Roosblad J, Kazanji M, Rousset D. Zika virus genome from the Americas. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10015):227-228. doi:10.1016/S0140-6736(16)00003-9
 14. Salvador FS, Fujita DM. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Med Infect Dis*. 2016;14(1):49-51. doi:10.1016/J.TMAID.2015.10.004
 15. Paz S, Semenza JC. El Niño and climate change—contributing factors in the dispersal of Zika virus in the Americas? *Lancet*. 2016;387(10020):745. doi:10.1016/S0140-6736(16)00256-7
 16. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. [https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations). Accessed July 3, 2019.
 17. Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus. [https://www.who.int/en/news-room/detail/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-\(2005\)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus](https://www.who.int/en/news-room/detail/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-(2005)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus). Accessed July 3, 2019.
 18. *Zika-Epidemiological Update Zika Virus-Incidence and Trends.*; 2016. <http://www.paho.org/>. Accessed July 3, 2019.
 19. Diagne CT, Diallo D, Faye O, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1):492. doi:10.1186/s12879-015-1231-2
 20. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, et al. Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. Attoui H, ed. *PLoS One*. 2014;9(10):e109442. doi:10.1371/journal.pone.0109442
 21. Grard G, Caron M, Mombo IM, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? Charrel R, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2681. doi:10.1371/journal.pntd.0002681
 22. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. Turell MJ, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004543. doi:10.1371/journal.pntd.0004543

23. Li C, Guo X, Deng Y, et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(1):1-7. doi:10.1038/emi.2017.8
24. Monaghan AJ, Morin CW, Steinhoff DF, et al. On the Seasonal Occurrence and Abundance of the Zika Virus Vector Mosquito *Aedes Aegypti* in the Contiguous United States. *PLoS Curr.* 2016. doi:10.1371/currents.outbreaks.50dfc7f46798675fc63e7d7da563da76
25. Ioos S, Mallet H-P, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine Mal Infect.* 2014;44(7):302-307. doi:10.1016/j.medmal.2014.04.008
26. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):880-882. doi:10.3201/eid1705.101939
27. D'Ortenzio E, Matheron S, de Lamballerie X, et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med.* 2016;374(22):2195-2198. doi:10.1056/NEJMc1604449
28. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(28):716-717. doi:10.15585/mmwr.mm6528e2
29. Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(14):372-374. doi:10.15585/mmwr.mm6514a3
30. Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(5):296-305. doi:10.1016/j.cmi.2016.12.027
31. Fréour T, Mirallié S, Hubert B, et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Eurosurveillance.* 2016;21(23):30254. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.23.30254
32. Atkinson B, Hearn P, Afrough B, et al. Detection of Zika Virus in Semen. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(5):940. doi:10.3201/eid2205.160107
33. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, et al. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Eurosurveillance.* 2016;21(32):30316. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30316
34. Arsuaga M, Bujalance SG, Díaz-Menéndez M, Vázquez A, Arribas JR. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(10):1107. doi:10.1016/S1473-3099(16)30320-6
35. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *N Engl J Med.* 2018;379(13):1234-1243. doi:10.1056/NEJMoa1613108

36. Prisant N, Bujan L, Benichou H, et al. Zika virus in the female genital tract. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(9):1000-1001. doi:10.1016/S1473-3099(16)30193-1
37. Calvet GA, Kara EO, Giozza SP, et al. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):49. doi:10.1186/s12879-018-2965-4
38. Musso D, Rouault E, Teissier A, et al. Molecular detection of Zika virus in blood and RNA load determination during the French Polynesian outbreak. *J Med Virol*. 2017;89(9):1505-1510. doi:10.1002/jmv.24735
39. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*. 2016;56(7):1684-1688. doi:10.1111/trf.13681
40. Colt S, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. Horstick O, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):e0005528. doi:10.1371/journal.pntd.0005528
41. Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol*. 2015;68:53-55. doi:10.1016/J.JCV.2015.04.021
42. Barzon L, Pacenti M, Berto A, et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(10):30159. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30159
43. Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(1):84-86. doi:10.3201/eid2101.140894
44. de M. Campos R, Cirne-Santos C, Meira GLS, et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *J Clin Virol*. 2016;77:69-70. doi:10.1016/J.JCV.2016.02.009
45. Sharma A, Lal SK. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Front Microbiol*. 2017;8:110. doi:10.3389/fmicb.2017.00110
46. Rubin R. A young woman contemplating travel abroad: What she needs to know about Zika virus infection. *Consultant*. 2016;56(11):1024-1025. doi:10.1056/NEJMoa1602412
47. França GVA, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet (London, England)*. 2016;388(10047):891-897. doi:10.1016/S0140-6736(16)30902-3
48. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr*. 2017;171(3):288. doi:10.1001/jamapediatrics.2016.3982

49. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2015;370(1663):20140066. doi:10.1098/rstb.2014.0066
50. Cheeran MC-J, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):99-126, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00023-08
51. Cao B, Diamond MS, Mysorekar IU. Maternal-Fetal Transmission of Zika Virus: Routes and Signals for Infection. *J Interf Cytokine Res.* 2017;37(7):287-294. doi:10.1089/jir.2017.0011
52. Miner JJ, Cao B, Govero J, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell.* 2016;165(5):1081-1091. doi:10.1016/j.cell.2016.05.008
53. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe.* 2016;20(1):83-90. doi:10.1016/j.chom.2016.05.015
54. Ahmad SSY, Amin TN, Ustianowski A. Zika virus: management of infection and risk. *BMJ.* 2016;352:i1062. doi:10.1136/bmj.i1062
55. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2321-2334. doi:10.1056/NEJMoa1602412
56. Zammarchi L, Stella G, Mantella A, et al. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol.* 2015;63:32-35. doi:10.1016/J.JCV.2014.12.005
57. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):359-361. doi:10.3201/eid2102.141363
58. Tappe D, Nachtigall S, Kapaun A, Schnitzler P, Günther S, Schmidt-Chanasit J. Acute Zika Virus Infection after Travel to Malaysian Borneo, September 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(5):911-913. doi:10.3201/eid2105.141960
59. Karimi O, Goorhuis A, Schinkel J, et al. Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection. *Lancet (London, England).* 2016;387(10022):939-940. doi:10.1016/S0140-6736(16)00502-X
60. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med.* 2016;374(20):1981-1987. doi:10.1056/NEJMs1604338
61. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. Baden LR, ed. *N Engl J Med.* 2016;374(16):1552-1563. doi:10.1056/NEJMra1602113

62. Leeper C, Lutzkanin A. Infections During Pregnancy. *Prim Care Clin Off Pract.* 2018;45(3):567-586. doi:10.1016/J.POP.2018.05.013
63. Chen H-L, Tang R-B. Why Zika virus infection has become a public health concern? *J Chinese Med Assoc.* 2016;79(4):174-178. doi:10.1016/J.JCMA.2016.03.001
64. Bordi L, Avsic-Zupanc T, Lalle E, Vairo F, Rosaria Capobianchi M, da Costa Vasconcelos PF. Emerging Zika Virus Infection: A Rapidly Evolving Situation. In: Springer, Cham; 2016:61-86. doi:10.1007/5584_2016_187
65. Rabaan AA, Bazzi AM, Al-Ahmed SH, Al-Ghaith MH, Al-Tawfiq JA. Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. *J Infect Public Health.* 2017;10(2):141-149. doi:10.1016/J.JIPH.2016.05.007
66. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(13):20751. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751
67. McAllister JP. Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012;17(5):285-294. doi:10.1016/j.siny.2012.06.004
68. Chu V, Petersen LR, Moore CA, et al. Possible Congenital Zika Syndrome in Older Children Due to Earlier Circulation of Zika Virus. *Am J Med Genet Part A.* 2018;176(9):1882-1889. doi:10.1002/ajmg.a.40378
69. Irwin ML, Cartmel B, Gross CP, et al. Randomized exercise trial of aromatase inhibitor-induced arthralgia in breast cancer survivors. *J Clin Oncol.* 2015;33(10):1104-1111. doi:10.1200/JCO.2014.57.1547
70. Edupuganti S, Natrajan MS, Roupheal N, et al. Biphasic Zika Illness With Rash and Joint Pain. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(3). doi:10.1093/ofid/ofx133
71. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet (London, England).* 2016;387(10027):1531-1539. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6
72. Parikh V, Tucci V, Galwankar S. Infections of the nervous system. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2012;2(2):82. doi:10.4103/2229-5151.97273
73. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(3):e13. doi:10.1038/emi.2016.141
74. Wong SS-Y, Poon RW-S, Wong SC-Y. Zika virus infection—the next wave after dengue? *J Formos Med Assoc.* 2016;115(4):226-242. doi:10.1016/J.JFMA.2016.02.002
75. Kuno G, Chang G-JJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol.* 2007;152(4):687-696. doi:10.1007/s00705-006-

0903-z

76. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44(1):649-688.
doi:10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
77. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):13-22. doi:10.1038/nrmicro1067
78. Roby JA, Hall RA, Setoh YX, Khromykh AA. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *J Gen Virol.* 2015;96(7):1551-1569.
doi:10.1099/vir.0.000097
79. Sironi M, Forni D, Clerici M, Cagliani R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. Powers AM, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004978. doi:10.1371/journal.pntd.0004978
80. Akey DL, Brown WC, Dutta S, et al. Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. *Science (80-).* 2014;343(6173):881-885. doi:10.1126/science.1247749
81. Cox BD, Stanton RA, Schinazi RF. Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. *Antivir Chem Chemother.* 2015;24(3-4):118-126.
doi:10.1177/2040206616653873
82. Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res.* 2015;118:148-158.
doi:10.1016/j.antiviral.2015.03.014
83. Zmurko J, Neyts J, Dallmeier K. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. *Rev Med Virol.* 2015;25(4):205-223. doi:10.1002/rmv.1835
84. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses.* 2013;6(1):69-88. doi:10.3390/v6010069
85. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses.* 2011;3(2):160-171. doi:10.3390/v3020160
86. Hoenen A, Liu W, Kochs G, Khromykh AA, Mackenzie JM. West Nile virus-induced cytoplasmic membrane structures provide partial protection against the interferon-induced antiviral MxA protein. *J Gen Virol.* 2007;88(11):3013-3017. doi:10.1099/vir.0.83125-0
87. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):365-375. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007

88. Garcia-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res.* 2016;134:244-249. doi:10.1016/j.antiviral.2016.09.010
89. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(9):699-708. doi:10.1038/nrmicro1928
90. Wu J, Lu G, Zhang B, Gong P. Perturbation in the Conserved Methyltransferase-Polymerase Interface of Flavivirus NS5 Differentially Affects Polymerase Initiation and Elongation. Perlman S, ed. *J Virol.* 2015;89(1):249-261. doi:10.1128/JVI.02085-14
91. Luo D, Xu T, Watson RP, et al. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *EMBO J.* 2008;27(23):3209-3219. doi:10.1038/emboj.2008.232
92. Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science (80-).* 2008;319(5871):1834-1837. doi:10.1126/science.1153264
93. Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(1). doi:10.1128/MMBR.00055-16
94. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002;108(5):717-725. doi:10.1016/s0092-8674(02)00660-8
95. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol.* 1997;71(11):8475-8481. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343204>. Accessed September 18, 2019.
96. Alves MP, Vielle NJ, Thiel V, Pfaender S. Research Models and Tools for the Identification of Antivirals and Therapeutics against Zika Virus Infection. *Viruses.* 2018;10(11):593. doi:10.3390/v10110593
97. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell.* 2016;19(2):258-265. doi:10.1016/j.stem.2016.04.014
98. Tang H, Hammack C, Ogden SC, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell.* 2016;18(5):587-590. doi:10.1016/j.stem.2016.02.016
99. Li C, Xu D, Ye Q, et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell.* 2016;19(1):120-126. doi:10.1016/j.stem.2016.04.017

100. Huang W-C, Abraham R, Shim B-S, Choe H, Page DT. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep*. 2016;6(1):34793. doi:10.1038/srep34793
101. Bayless NL, Greenberg RS, Swigut T, Wysocka J, Blish CA. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe*. 2016;20(4):423-428. doi:10.1016/j.chom.2016.09.006
102. Himmelsbach K, Hildt E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World J Virol*. 2018;7(1):10-20. doi:10.5501/wjv.v7.i1.10
103. Chan JF-W, Yip CC-Y, Tsang JO-L, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(1):1-12. doi:10.1038/emi.2016.99
104. Waggoner JJ, Pinsky BA. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. Kraft CS, ed. *J Clin Microbiol*. 2016;54(4):860-867. doi:10.1128/JCM.00279-16
105. Willard K, Demakovskiy L, Tesla B, et al. Zika Virus Exhibits Lineage-Specific Phenotypes in Cell Culture, in *Aedes aegypti* Mosquitoes, and in an Embryo Model. *Viruses*. 2017;9(12):383. doi:10.3390/v9120383
106. Nikolay A, Castilho LR, Reichl U, Genzel Y. Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. *Vaccine*. 2018;36(22):3140-3145. doi:10.1016/j.vaccine.2017.03.018
107. Bhatnagar J, Rabeneck DB, Martines RB, et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(3):405-414. doi:10.3201/eid2303.161499
108. Tabata T, Pettit M, Puerta-Guardo H, et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe*. 2016;20(2):155-166. doi:10.1016/j.chom.2016.07.002
109. Miner JJ, Sene A, Richner JM, et al. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Rep*. 2016;16(12):3208-3218. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.079
110. Sun J, Wu D, Zhong H, et al. Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(11):1330. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.3417
111. Chen JC, Wang Z, Huang H, et al. Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. *Int J Infect Dis*. 2016;51:139-140. doi:10.1016/j.ijid.2016.07.015

112. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*. 2016;540(7633):438-442. doi:10.1038/nature20556
113. Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell*. 2016;167(6):1511-1524.e10. doi:10.1016/j.cell.2016.11.016
114. Coronell-Rodríguez W, Arteta-Acosta C, Suárez-Fuentes MA, et al. Infección por virus del Zika en el embarazo, impacto fetal y neonatal. *Rev Chil infectología*. 2016;33(6):665-673. doi:10.4067/S0716-10182016000600009
115. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880-8896. doi:10.1128/JVI.00354-15
116. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(2):155-170. doi:10.1093/femsre/fuu004
117. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*. 1997;3(8):866-871. doi:10.1038/nm0897-866
118. Kim SY, Zhao J, Liu X, et al. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry*. 2017;56(8):1151-1162. doi:10.1021/acs.biochem.6b01056
119. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197(7):823-829. doi:10.1084/jem.20021840
120. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. 2003;4(7):723-728. doi:10.1038/sj.embor.embor866
121. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. *TIM* genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2010;235(1):172-189. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00903.x
122. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(12):769-785. doi:10.1038/nrc3847
123. Amara A, Mercer J. Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(8):461-469. doi:10.1038/nrmicro3469
124. McIntire JJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility

- gene. *Springer Semin Immunopathol.* 2004;25(3-4):335-348. doi:10.1007/s00281-003-0141-3
125. Encinas JA, Kuchroo VK. Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(6):691-697. doi:10.1016/S0952-7915(00)00164-3
 126. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(6):454-462. doi:10.1038/nri1111
 127. DeKruyff RH, Bu X, Ballesteros A, et al. T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 Allelic Variants Differentially Recognize Phosphatidylserine and Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J Immunol.* 2010;184(4):1918-1930. doi:10.4049/jimmunol.0903059
 128. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):965-975. doi:10.1038/nri957
 129. Umetsu SE, Lee W-L, McIntire JJ, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2005;6(5):447-454. doi:10.1038/ni1186
 130. Nakae S, Iikura M, Suto H, et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood.* 2007;110(7):2565-2568. doi:10.1182/blood-2006-11-058800
 131. Ichimura T, Asseldonk EJP v., Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre J V. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest.* 2008;118(5):1657-1668. doi:10.1172/JCI34487
 132. Kobayashi N, Karisola P, Peña-Cruz V, et al. TIM-1 and TIM-4 Glycoproteins Bind Phosphatidylserine and Mediate Uptake of Apoptotic Cells. *Immunity.* 2007;27(6):927-940. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.011
 133. Moller-Tank S, Kondratowicz AS, Davey RA, Rennert PD, Maury W. Role of the Phosphatidylserine Receptor TIM-1 in Enveloped-Virus Entry. *J Virol.* 2013;87(15):8327-8341. doi:10.1128/JVI.01025-13
 134. Tietjen GT, Gong Z, Chen C-H, et al. Molecular mechanism for differential recognition of membrane phosphatidylserine by the immune regulatory receptor Tim4. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(15):E1463-E1472. doi:10.1073/pnas.1320174111
 135. Santiago C, Ballesteros A, Martínez-Muñoz L, et al. Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin Protein 4 Show a Metal-Ion-Dependent Ligand Binding Site where Phosphatidylserine Binds. *Immunity.* 2007;27(6):941-951. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.008
 136. Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, et al. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple

- Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. Pierson TC, ed. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003232. doi:10.1371/journal.ppat.1003232
137. Mercer J, Helenius A. Apoptotic mimicry: phosphatidylserine-mediated macropinocytosis of vaccinia virus. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1209(1):49-55. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05772.x
138. Lemke G, Rothlin C V. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):327-336. doi:10.1038/nri2303
139. Shafit-Zagardo B, Gruber RC, DuBois JC. The role of TAM family receptors and ligands in the nervous system: From development to pathobiology. *Pharmacol Ther.* 2018;188:97-117. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.03.002
140. van der Meer JHM, van der Poll T, van 't Veer C, Batard MA, Griffin JH. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood.* 2014;123(16):2460-2469. doi:10.1182/blood-2013-09-528752
141. Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Adv Cancer Res.* 2008;100:35-83. doi:10.1016/S0065-230X(08)00002-X
142. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996;271(47):30022-30027. doi:10.1074/jbc.271.47.30022
143. Lew ED, Oh J, Burrola PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife.* 2014;3. doi:10.7554/eLife.03385
144. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, et al. Structural basis for Gas6–Axl signalling. *EMBO J.* 2006;25(1):80-87. doi:10.1038/sj.emboj.7600912
145. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a009076. doi:10.1101/cshperspect.a009076
146. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112-124. doi:10.1038/nrm2330
147. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med.* 2010;207(9):1807-1817. doi:10.1084/jem.20101157
148. Mercer J. Viral Apoptotic Mimicry Party: P.S. Bring Your Own Gas6. *Cell Host Microbe.* 2011;9(4):255-257. doi:10.1016/j.chom.2011.04.002
149. Soares MM, King SW, Thorpe PE. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nat Med.* 2008;14(12):1357-1362. doi:10.1038/nm.1885
150. Morizono K, Xie Y, Olafsen T, et al. The Soluble Serum Protein Gas6 Bridges Virion

- Envelope Phosphatidylserine to the TAM Receptor Tyrosine Kinase Axl to Mediate Viral Entry. *Cell Host Microbe*. 2011;9(4):286-298. doi:10.1016/j.chom.2011.03.012
151. Bhattacharyya S, Zagórska A, Lew ED, et al. Enveloped Viruses Disable Innate Immune Responses in Dendritic Cells by Direct Activation of TAM Receptors. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):136-147. doi:10.1016/j.chom.2013.07.005
 152. Moller-Tank S, Albritton LM, Rennert PD, Maury W. Characterizing Functional Domains for TIM-Mediated Enveloped Virus Entry. *J Virol*. 2014;88(12):6702-6713. doi:10.1128/JVI.00300-14
 153. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, et al. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe*. 2012;12(4):544-557. doi:10.1016/j.chom.2012.08.009
 154. Rothlin C V., Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. *Cell*. 2007;131(6):1124-1136. doi:10.1016/j.cell.2007.10.034
 155. Lee I, Bos S, Li G, et al. Probing Molecular Insights into Zika Virus-Host Interactions. *Viruses*. 2018;10(5). doi:10.3390/v10050233
 156. Wells MF, Salick MR, Wiskow O, et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell*. 2016;19(6):703-708. doi:10.1016/j.stem.2016.11.011
 157. Hastings AK, Yockey LJ, Jagger BW, et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep*. 2017;19(3):558-568. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.058
 158. Leventis PA, Grinstein S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu Rev Biophys*. 2010;39(1):407-427. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131234
 159. Maruri-Avidal L, Weisberg AS, Moss B. Direct formation of vaccinia virus membranes from the endoplasmic reticulum in the absence of the newly characterized L2-interacting protein A30.5. *J Virol*. 2013;87(22):12313-12326. doi:10.1128/JVI.02137-13
 160. Morizono K, Chen ISY. Role of phosphatidylserine receptors in enveloped virus infection. *J Virol*. 2014;88(8):4275-4290. doi:10.1128/JVI.03287-13
 161. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696326>. Accessed September 26, 2019.
 162. Kuadkitkan A, Wikan N, Fongsaran C, Smith DR. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*. 2010;406(1):149-161. doi:10.1016/j.virol.2010.07.015

163. Fibriansah G, Ng T-S, Kostyuchenko VA, et al. Structural Changes in Dengue Virus When Exposed to a Temperature of 37 C. *J Virol.* 2013;87(13):7585-7592. doi:10.1128/JVI.00757-13
164. Zhang X, Sheng J, Plevka P, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(17):6795-6799. doi:10.1073/pnas.1304300110
165. Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol.* 2008;89(12):3047-3051. doi:10.1099/vir.0.2008/002535-0
166. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, et al. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 2003;22(11):2604-2613. doi:10.1093/emboj/cdg270
167. Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I. Zika virus. *BMJ.* 2016;352:i1049. doi:10.1136/bmj.i1049
168. Agbulos DS, Barelli L, Giordano B V., Hunter FF. Zika Virus: Quantification, Propagation, Detection, and Storage. In: *Current Protocols in Microbiology*. Vol 43. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016:15D.4.1-15D.4.16. doi:10.1002/cpmc.19
169. Savidis G, McDougall WM, Meraner P, et al. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Rep.* 2016;16(1):232-246. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.028
170. Savidis G, Perreira JM, Portmann JM, et al. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *Cell Rep.* 2016;15(11):2323-2330. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.074
171. Barreto-Vieira DF, Jácome FC, da Silva MAN, et al. Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. Xing Z, ed. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184397. doi:10.1371/journal.pone.0184397
172. Wang J, Qiao L, Hou Z, Luo G. TIM-1 Promotes Hepatitis C Virus Cell Attachment and Infection. *J Virol.* 2017;91(2):e01583-16. doi:10.1128/JVI.01583-16
173. Kondratowicz AS, Lennemann NJ, Sinn PL, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(20):8426-8431. doi:10.1073/pnas.1019030108
174. Begum F, Das S, Mukherjee D, Ray U. Hijacking the Host Immune Cells by Dengue Virus: Molecular Interplay of Receptors and Dengue Virus Envelope. *Microorganisms.* 2019;7(9):323. doi:10.3390/microorganisms7090323
175. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus — reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(11):707-715. doi:10.1038/nrmicro.2016.125

176. Haque A, Pant AB. Potential Therapeutics: To Hold in the Fight against Zika Virus. *J Bioanal Biomed* 2017 94. 2017;9(4):1-9. doi:10.4172/1948-593x.1000175
177. Abbink P, Stephenson KE, Barouch DH. Zika virus vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(10):594-600. doi:10.1038/s41579-018-0039-7
178. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(3):125-142. doi:10.1038/nrmicro.2017.170
179. Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol*. 2018;19(11):1189-1198. doi:10.1038/s41590-018-0210-3
180. Angiari S, Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. *Trends Mol Med*. 2014;20(12):675-684. doi:10.1016/j.molmed.2014.10.003

