



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

***Estudio de la probable interacción del virus de Zika con los
receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en células de cuello
uterino***

Tesis que para obtener el título de:

**Maestría en Ciencias (Microbiología)
Microbiología Médica**

Presenta:

M.C. Janina Ninette Robles Minutti

Directora de Tesis:

Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

Asesor de Tesis:

Dr. Gerardo Santos López

PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE 2024



BUAP

Puebla, Pue. a 9 de enero 2025.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del comité revisor de tesis de Maestría de la alumna **Janina Ninette Robles Minutti**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio de la probable interacción del virus de Zika con los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en células de cuello uterino”

A nuestro juicio, la alumna **Janina Ninette Robles Minutti** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. Luis Márquez Domínguez


D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

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 (Protocolo R-2024-2106-009). Como alumna de posgrado recibí la beca del Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) con número (CVU): 1170023, a partir de la fecha 01 de agosto de 2022 hasta el 31 de julio de 2024.

*“Yo, Beatriz, soy quien te hace caminar;
vengo del sitio al que volver deseo;
amor me mueve, amor me lleva a
hablarte”.*

(Canto II, v70 al 73).

La Divina Comedia

Dante Alighieri

Para Dante,

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al **Dr. Gerardo Santos López**, no hay palabras suficientes para expresar mi agradecimiento por haberme aceptado en su grupo de investigación. Gracias por creer en mí, aunque al principio no diera un peso por mi (ya da dos), y por apostar por que un médico podría crecer y desarrollar un proyecto en su laboratorio. Aprecio profundamente su apoyo constante, sus palabras alentadoras, su conocimiento invaluable y su característico humor que siempre supo hacer más ligero este camino.

Al **Dr. Luis Márquez Domínguez**, mentor, maestro, máster, teacher: nunca habría logrado esto sin usted. Gracias por enseñarme innumerables técnicas y lo que significa realmente trabajar en un laboratorio. Aunque en ocasiones las críticas en los tutoriales me hicieron llorar, aprendí lo que es la verdadera crítica constructiva y cómo afrontarla. No tengo palabras suficientes para agradecerle el apoyo emocional que me brindó en los momentos más difíciles.

A la **Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, por aceptar ser mi asesora: gracias por su meticulosa atención a los detalles, por sus clases maravillosas y por el compromiso que siempre mostró con este proyecto. Sin su guía y apoyo, este trabajo jamás habría sido posible.

Finalmente, al comité revisor: **Dra. Rosa del Carmen Rocha García, Dra. Sandra Raquel Reyes Carmona y Dra. Claudia Fabiola Martínez de la Peña**, muchas gracias por el tiempo que dedicaron a cada tutorial y por sus valiosas contribuciones. Sus comentarios y observaciones fueron esenciales para convertir esta tesis en un proyecto sólido y enriquecedor.

Y a la **Dra. Julia María Alatorre Cruz** por su invaluable apoyo a la estadística de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, **Jaime y Terry**, GRACIAS por todo su apoyo, gracias por creer en mí, por apoyar cada uno de mis proyectos e ideas locas. Gracias por siempre ser mi red de salvación en momentos difíciles, somos los tres contra el mundo. Gracias por enseñarme a pensar como científico, a amar el arte, y a siempre validar mis sentimientos. Los amo con cada fibra de mi ser y haría todo por ustedes. SIEMPRE.

A mis primas **Neni y Kelincho el bicho**, por escucharme llorar, por alimentarme de risas y por ayudarme cuando estaba más perdida. Kelin, siempre tendremos Barcelona. **Omar**, gracias por la increíble portada.

A mis tías **Jaqueline, Gina y Lilia** por su amor, su comida y abrirme sus brazos y su hogar. Y en honor a mis tíos **Raul y Roberto** (descansen en paz).

Pero no hay manera de expresar el agradecimiento hacia mi prima **Ximena**, mi legado, gracias por verme como una modelo a seguir porque eso me inspira a ser cada día mejor, gracias por reírte conmigo, llorar conmigo, acostarnos a ver el techo y decir ¿MK CÓMO ASÍ? ¡YA DÉNME UNA BECA! Cada cosa que te he enseñado y toda la confianza que has depositado en mí me han hecho la mejor versión de mí como persona y como maestra.

Luis, de nuevo, no hay palabras que describan el agradecimiento que tengo hacia ti, gracias por esas salidas en grupo, gracias por estar ahí cuando lloré incontables veces en contención. Gracias por enseñarme a tomar el dolor y convertirlo en fuerza.

Chicos, **Lore, Max, Lis, Victor, Cris, Gabo, Eri, Dani, Brian, Alan el foco y bebé Alan, Yas, Zyan, Fer, Donovan y Fani**. Gracias por dejarme enseñarles, gracias por aprender conmigo, gracias por abrazarme al llorar, por ayudarme en los experimentos, gracias por los momentos y las risas, las bromas. Son lo mejor que me pudo haber pasado. Gracias por darme el placer de llamarlos colegas, compañeros y amigos.

Y finalmente a todas las personas que confiaron en mí, y a las que no también, gracias por ayudarme a entrar a la maestría y a otros por apoyarme durante este largo viaje. Gracias a los que se fueron y a los que llegaron.

A todos, GRACIAS.

Contenido

.....	2
RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES	3
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	5
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	6
ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABLAS	13
RESUMEN.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Epidemiología.....	17
1.2 Transmisión	18
1.2.1 Transmisión por picadura de mosquito	18
1.2.2 Transmisión por contacto con tejidos y fluidos contaminados	19
1.2.3 Transmisión materno-fetal.....	20
1.2.4 Transmisión sexual	21
1.3 Fiebre de Zika	23
1.4 Complicaciones por la fiebre de Zika.....	23
1.5 Agente etiológico	24
1.5.1 Genoma del virus de Zika.....	24
1.5.2 Proteínas estructurales y no estructurales	25
1.6 Ingreso a la célula	26
1.7 Ciclo replicativo.....	29
2. ANTECEDENTES GENERALES	33
2.1 Reproducción del vector.....	34
2.2 Interacción de los receptores del mosquito con el virus de Zika	35
2.3 Interacción de los receptores humanos con el virus de Zika.....	36
2.3.1 Receptores de fosfatidilserina TYRO-3, AXL, TIM-1 (receptores TAM)	36
2.3.2 Receptores de lectina tipo-C DC-SIGN (CD209) y CLEC5A	36
2.3.3 Moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) NCAM1.	37
2.3.4 Integrina $\alpha V\beta 5$	38

2.3.5 Glicosaminoglicanos.....	39
2.3.6 Receptores tirosina-cinasa: EGFR.....	40
2.3.7 Receptores Fc gamma (Fc γ R)	41
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	42
3.1 Interacción del virus de Zika con receptores del tracto genitourinario femenino	42
3.2 Estudio de los receptores TIM y TAM en la línea celular de riñón de hámster neonato (BHK-21).....	44
4. JUSTIFICACIÓN	44
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
6. HIPOTESIS	45
7. OBJETIVOS.....	45
7.1 Objetivo general.....	45
7.1.1 Objetivos específicos	45
8. METODOLOGÍA	46
8.1 Cultivo celular.....	46
8.1.1 Células C6/36	46
8.1.2 Células BHK-21.....	46
8.1.3 Células C33-A	47
8.2 Cepa del virus de Zika.....	47
8.3 Propagación del virus de Zika.....	47
8.4 Titulación del virus de Zika.....	47
8.5 Cinética de replicación viral	49
8.6 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular C33-A.....	49
8.7 Identificación de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A.....	50
8.8 Bloqueo de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A	52
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
9.1 Propagación del virus de Zika.....	53
9.2 Titulación del virus de Zika.....	55
9.3 Cinética de replicación viral	57
9.4 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular C33-A.....	59
9.5 Identificación de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A.....	60
9.6 Expresión de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO3 en respuesta a la infección por el virus de Zika	62

9.7	Bloqueo de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A con anticuerpos específicos.....	67
10.	CONCLUSIÓN.....	70
11.	REFERENCIAS.....	73
12.	ANEXOS	82

ABREVIATURAS

A549	Línea celular de cáncer de pulmón humano de células no pequeñas
ADE	Potenciación de la infección mediada por anticuerpos
AFL	AlexaFluor
ARN	Ácido ribonucleico
BHK-21	Línea celular de riñón de hámster neonato
BSA	Albúmina sérica bovina
C33-A	Línea celular de carcinoma cervicouterino humano
C6/36	Línea celular de larva de mosquito <i>Aedes Albopictus</i>
CHO	Línea celular de ovario de hámster chino
cHP	Región de codificación de la cápside
CLEC5	Miembro de la familia de dominios de lectina tipo C 5, miembro A
CN	Control negativo
CPE	Efecto citopático
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas
CS	Secuencia de ciclación
C-TLR	Receptores de lectina tipo C
DAR	Región río abajo del AUG
	Molécula de adhesión intracelular 3 no asociado a integrina, específica de
DC-SIGN	células dendríticas
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EC	Enterocitos
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

FAK	Cinasa de adhesión focal
Fc	Fracción cristalizable
FcRs	Receptores FC
GAG	Glicosaminoglicanos
h.p.i.	Horas post-infección
HCEC	Línea celular de células epiteliales de colon humano
HEK 297T	Línea celular de riñón embrionario humano
HUVEC	Línea celular de células endoteliales primarias de vena umbilical humana
IFN	Interferón
L-SIGN	Molécula de adhesión intracelular 3 asociada a integrina específica de hígado/nódulo linfático
MAVS	Proteína de señalización antiviral mitocondrial
MEM	Medio esencial mínimo
MMR	Receptor de manosa
MOI	Multiplicidad de infección
mosGCTLs	Lectinas tipo C del mosquito
NCAM1	Molécula de Adhesión Celular Neural 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de cloruro de sodio y fosfatos
PBST	Solución amortiguadora de cloruro de sodio y fosfatos con tritón
R.E.R	Retículo endoplásmico rugoso
RTK	Receptor de tirosina-cinasa
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
SD	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SLA	Bucle de tallo A
SLB	Bucle de tallo B
U-251 MG	Línea celular humana de glioblastoma multiforme
UAR	Región río arriba del AUG
UFP	Unidades formadoras de placas líticas

WNV	Virus de West Nile
ZIKV	Virus de Zika

LISTA DE FIGURAS

1	Barreras de tejido para la infección por arbovirus	19
2	Transmisión materno-fetal del virus de Zika	21
3	Ciclo de replicación del genoma del virus de Zika	29
4	Circularización de los flavivirus	32
5	Modelo para el control de la iniciación de la traducción mediante la circularización del genoma	33
6	Ciclo de vida del mosquito	34
7	Efecto citopático en la propagación del virus de Zika en la línea celular C6/36 a través del tiempo (0, 24, 48 y 72 hrs)	54
8	Titulación del virus de Zika en la línea celular BHK-21	56
9	Cinética de replicación viral	58
10	Presencia de la proteína E a diferentes diluciones virales	60
11	Presencia de las proteínas TYRO-3, AXL y TIM-1 en la superficie de células C33-A con y sin infección	61
12	Expresión del receptor AXL en células C33-A en respuesta a la infección por el virus de Zika	63

13	Comparación entre el control negativo y las células C33-A infectadas con ZIKV a las 12 horas post-infección	63
14	Expresión de los receptores TIM-1 y TYRO-3 en células C33-A en respuesta a la infección por el virus de Zika	65
15	Bloqueo de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO3 en la infección por el virus de Zika en células C33-A	68

LISTA DE TABLAS

1	Comparación estadística de la expresión del receptor AXL en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.01	83
2	Comparación estadística de la expresión del receptor AXL en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.001	84
3	Comparación estadística de la expresión del receptor AXL en células C33-A entre MOI 0.01 y MOI 0.001	85
4	Comparación estadística de la expresión del receptor TIM-1 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.01	86
5	Comparación estadística de la expresión del receptor TIM-1 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.001	87
6	Comparación estadística de la expresión del receptor TIM-1 en células C33-A entre MOI 0.01 y MOI 0.001	88
7	Comparación estadística de la expresión del receptor TYRO-3 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.01	89
8	Comparación estadística de la expresión del receptor TYRO-3 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.001	90
9	Comparación estadística de la expresión del receptor TYRO-3 en células C33-A entre MOI 0.01 y MOI 0.001	91

RESUMEN

La infección por el virus de Zika (ZIKV), aunque generalmente se manifiesta como una enfermedad leve caracterizada por fiebre, artralgia, artritis, erupción cutánea y conjuntivitis, ha sido vinculada a complicaciones severas como microcefalia en neonatos y síndrome de Guillain-Barré, subrayando la necesidad de comprender en profundidad sus mecanismos de infección. Este estudio presenta un enfoque innovador al investigar, por primera vez, la interacción del ZIKV con las proteínas de membrana AXL, TIM-1 y TYRO-3 en células de cérvix uterino humano (línea celular C33-A). Se utilizó la línea celular BHK-21 como referencia y las células C33-A como modelo específico, identificándose las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 mediante anticuerpos específicos y técnicas avanzadas de marcaje con fluorescencia. Los resultados revelaron que estas proteínas se expresan en la superficie de las células C33-A y que su señal aumenta significativamente tras la infección, particularmente para AXL, mientras que TIM-1 y TYRO-3 mostraron un comportamiento estable en los ensayos. Los bloqueos específicos con anticuerpos dirigidos a estos receptores, tanto individualmente como en combinación, lograron reducir la infección viral de manera significativa, siendo más efectiva la inhibición simultánea de los tres receptores. Sin embargo, ningún tratamiento bloqueó completamente la infección, sugiriendo la participación de moléculas adicionales en el proceso de entrada viral. Este estudio sienta las bases para entender los mecanismos de infección por ZIKV en el tracto genitourinario femenino a través de la vía sexual.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infection, although generally presenting as a mild illness characterized by fever, arthralgia, arthritis, rash, and conjunctivitis, has been linked to severe complications such as microcephaly in neonates and Guillain-Barré syndrome, underscoring the urgent need to deeply understand its mechanisms of infection. This study introduces an innovative approach by investigating, for the first time, the interaction of ZIKV with the membrane proteins AXL, TIM-1, and TYRO-3 in human cervical cells (C33-A cell line). The BHK-21 cell line was used as a reference, while C33-A cells served as a specific model. The proteins AXL, TIM-1, and TYRO-3 were identified using specific antibodies and advanced fluorescence labeling techniques. The results revealed that these proteins are expressed on the surface of C33-A cells, with significant signal increases observed following infection, particularly for AXL, while TIM-1 and TYRO-3 exhibited stable behavior in the assays. Specific antibody-mediated blockade of these receptors, both individually and in combination, significantly reduced viral infection with the simultaneous inhibition of all three receptors proving to be the most effective. However, no treatment fully eliminated infection, suggesting the involvement of additional molecules in the viral entry process. This study lays the groundwork for understanding ZIKV infection mechanisms in the female genital tract through sexual transmission pathways.

1. INTRODUCCIÓN

El virus de Zika (ZIKV) está clasificado en el género *Orthoflavivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae* (Postler et al., 2023). Es transmitido al humano, principalmente por la picadura de mosquitos del género *Aedes*, especialmente *A. aegypti* y *A. albopictus*. Se aisla por primera vez en 1947 en un mono Rhesus en el Bosque de Zika en Uganda, lugar del que toma nombre (Dick et al., 1952).

El ZIKV produce una enfermedad conocida como la fiebre de Zika, la cual se caracteriza por un cuadro clínico inespecífico que comienza entre dos y diez días después de la picadura del mosquito (Musso & Gubler, 2016), y consiste en fiebre leve, exantema maculopapular pruriginoso, cefalea, mialgias, artralgias, malestar general y conjuntivitis no purulenta que suele resolverse en 5-7 días (Bhardwaj et al. 2021).

Sin embargo, se han identificado cuadros graves como la microcefalia, presentada en bebés cuyas madres se infectan durante el periodo de gestación (Freitas et al. 2020), así como síndrome de Guillain-Barré (SGB) en adultos (Pérez-Cabezas et al., 2019). Estas manifestaciones, aunadas a un aumento repentino de casos durante el inicio del siglo XXI, llevaron a la OMS a declarar, en febrero de 2016, la infección por el ZIKV como una “emergencia de salud pública de nivel internacional” (Martins et al., 2021, OMS, 2016).

Se ha identificado en diversos estudios la presencia del virus en moco cervical (Carrera et al., 2014) (Prisant et al., 2016), lo cual sugiere que las células cervicales tienen susceptibilidad a la infección y podrían jugar un papel importante en la transmisión. Se conocen diversos receptores celulares, como por ejemplo AXL, TIM-1 y TYRO-3, los cuales

(aunque no están presente en el moco celular) podrían estar relacionados con el ingreso del virus a la célula y su posterior replicación (Meertens et al., 2012; Xie et al., 2021).

1.1 Epidemiología

El ZIKV es aislado por primera vez en 1947 en el Bosque de Zika en Uganda, a partir de un mono *Rhesus* que formaba parte de un estudio sobre el virus de la fiebre amarilla. En 1948, el virus también se aísla de *Aedes africanus*, y los primeros casos reportados de infección en humanos se registran en 1952 en África (Dick et al., 1952). Entre 1951 y 1981, se evidencian infecciones causadas por el virus de Zika en humanos en África y Asia (Hayes, 2009).

Por causas desconocidas el siguiente brote se presenta fuera de estos dos continentes, en la isla Yap, en el Pacífico Occidental en 2007 (Musso & Gubler, 2016). Le sigue una gran epidemia en la Polinesia Francesa alrededor del 2013-2014, donde se detectan los casos de SGB. Posteriormente, el virus migra a regiones como Australia, Europa y Japón (Song et al., 2017).

En 2015, se detecta la primera transmisión autóctona del virus de Zika en el noreste de Brasil (Zanluca et al., 2015). Durante este brote, aumentan los casos de microcefalia en recién nacidos en las áreas afectadas por el virus. Se cree que la introducción del virus en Brasil se asocia con participantes y viajeros a la Copa Mundial de la FIFA llevado a cabo ese año en Brasil, así mismo, fenómenos como el calentamiento global y el fenómeno meteorológico “El Niño” pueden haber acelerado la propagación del vector y por consiguiente del virus hacia América Central, del Sur y el Caribe (Schuler-Faccini et al., 2016). En este mismo año, la OMS, declara la infección por el ZIKV como una “emergencia de salud pública a nivel internacional”, la cual se desactiva a finales del mismo año por el decaimiento de casos.

Hasta el momento, en América se han reportado 999,884 casos al cierre del año 2023 (PAHO, 2023).

1.2 Transmisión

Los flavivirus, y en particular el ZIKV, son transmitidos por mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diagne et al., 2015). Y si bien, esta es la forma más común, se han encontrado distintas formas como la materno-fetal, sexual y contacto con material, fluidos y sangre contaminada. Además, por transfusiones y por trasplantes con órganos o tejidos contaminados, y el contacto con personal de laboratorio diagnóstico o de investigación (Gregory et al., 2017).

1.2.1 Transmisión por picadura de mosquito

Un estudio realizado por Cui y Franz (2020) elucida que el intestino medio del mosquito hembra sirve como el sitio inicial de infección por ZIKV. El estudio identifica seis tipos celulares distintos: células madre, enteroblastos, enteroblastos en diferenciación, células enteroendocrinas, enterocitos (EC), células similares a EC, células del cardias y células del músculo visceral. Al alimentarse, los viriones entran en las células epiteliales del intestino medio mediante endocitosis mediada por receptores, similar al proceso observado en humanos (Franz et al., 2015). Para la transmisión por su vector mosquito, el arbovirus debe infectar las células epiteliales del intestino medio, replicarse, diseminarse y finalmente infectar las glándulas salivales (Salazar et al., 2007) (**figura 1**).

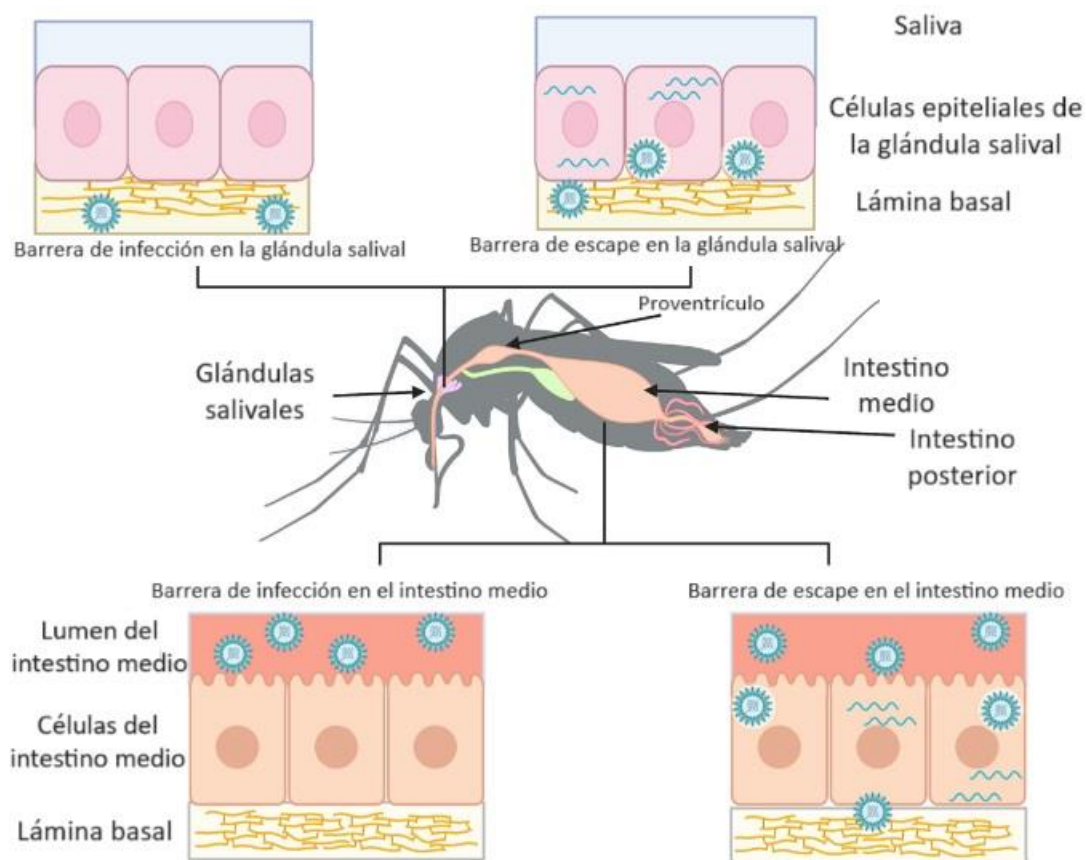


Figura 1. Barreras de tejido para la infección por arbovirus. Una barrera de infección del intestino medio (abajo a la izquierda) ocurre cuando un virus no es capaz de entrar o no es capaz de replicarse en las células del epitelio intestinal medio. En contraste, una barrera de escape del intestino medio (abajo a la derecha) ocurre cuando el virus infecta y se replica en células del intestino medio, pero no se disemina de este tejido. Una barrera de infección en la glándula salival (arriba a la izquierda) ocurre cuando el virus falla en infectar a las glándulas salivales, mientras que una barrera de escape en la glándula salival (arriba a la derecha) sucede cuando el virus es capaz de pasar a la saliva. Tomado y modificado de (Carpenter & Clem, 2023).

1.2.2 Transmisión por contacto con tejidos y fluidos contaminados

Como mencionan Gregory y colaboradores (2017) en su artículo de revisión, se han descubierto métodos de transmisión distintos a la picadura de mosquito. Por ejemplo, en Brasil en el año 2016, se detectan 3 casos de pacientes que adquieren el virus por transfusión sanguínea y plaquetaria (Barjas-Castro et al., 2016; Motta et al., 2016).

Del mismo modo, a lo largo de los años, primero en la década de los setenta y posteriormente en la de los ochenta, se identifican diversos casos de laboratoristas que tras tener contacto con muestras infectadas y solo después de haberse expuesto —por ejemplo, tras un pinchazo con una aguja— comienzan a presentar síntomas de fiebre de Zika. El diagnóstico de laboratorio confirma que son portadores del virus, sin haber tenido ningún otro tipo de exposición (Filipe et al., 1973; Simpson, 1964).

Hasta ahora se han presentado casos donde se comprueba una transmisión secundaria con ZIKV. Además, estudios mediante RT-PCR para identificar el genoma viral en distintos fluidos como orina, saliva y leche materna, sugieren que de haber exposición a ellos la transmisión sería posible (Barzon et al., 2016; Musso & Gubler, 2016).

1.2.3 Transmisión materno-fetal

Esta forma de transmisión, si bien no es la más común, es la más sustancial por las complicaciones que presenta en el producto en gestación. Cuando una mujer embarazada es infectada con el ZIKV, los viriones son capaces de atravesar la barrera transplacentaria e infectar al feto, afectando su sistema nervioso, tejido cerebral y destruirlo parcialmente, ocasionando microcefalia, anencefalia, anomalías cerebrales, déficit visual y auditivo, entre otros (Freitas et al., 2020).

El mecanismo exacto mediante el cual el virus penetra la barrera transplacentaria no se ha esclarecido, sin embargo, estudios recientes como el realizado por Wu y colaboradores (2023) demuestran que el ZIKV ataca a las células trofoblásticas humanas y evita la sincitialización en organoides trofoblásticos placentarios en cultivo. Otro estudio, realizado

por Quicke y colaboradores (2016) demuestra que una cepa de ZIKV es capaz de replicarse en los macrófagos y citotrofoblastos de la placenta humana (**figura 2**).

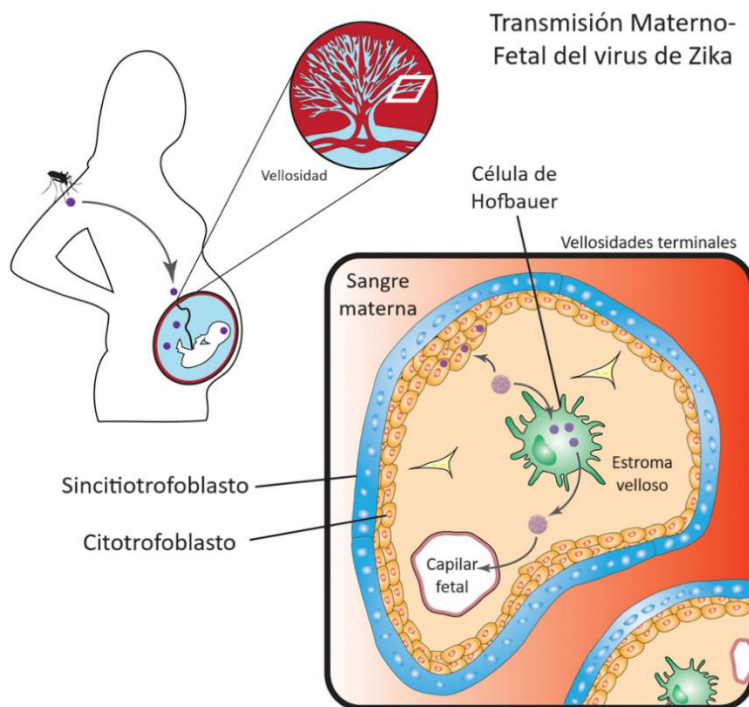


Figura 2. Transmisión materno-fetal del virus de Zika. Esquema de la infección y replicación en células de Hofbauer y citotrofoblastos de la placenta humana, lo cual sugiere una ruta de cruce a través de la barrera placentaria por el virus de Zika. Tomado y modificado de Quicke et al. (2016).

1.2.4 Transmisión sexual

Uno de los primeros casos de transmisión sexual del ZIKV se documenta en 2008, cuando dos científicos viviendo en Bandafassi, Senegal, arriban a su residencia en el norte de Colorado, Estados Unidos, y comienzan a presentar sintomatología consistente con la fiebre de Zika tras 6-9 días posteriores a su llegada en agosto. Una enfermera, esposa del paciente 1, comienza a presentar sintomatología similar en septiembre de ese mismo año, ella no visita Senegal, sin embargo, mantiene relaciones sexuales con su esposo posterior a su arribo (Foy et al., 2011). Así mismo, en febrero de 2016 un hombre de 61 años residente de Estados

Unidos, tras viajar a Martinica, comienza a presentar sintomatología tal como erupción maculopapular, hiperemia conjuntival, artralgia, sin fiebre. Estudios realizados en el día 53 desde el inicio de los síntomas demuestran la presencia del virus. La esposa de dicho paciente no presenta sintomatología hasta 40 días posteriores a su regreso a los Estados Unidos, donde presenta una erupción maculopapular y artralgia, sin fiebre. Considerando que el tiempo de incubación es de entre 3-12 días, se descarta la posibilidad de infección por picadura de mosquito, sin embargo, refiere haber sostenido relaciones sexuales con su esposo durante los días 32 y 41 posteriores a la infección de su esposo. Esto lleva a los médicos a hipotetizar que la infección se presenta a partir del contacto sexual (Turmel et al., 2016).

A raíz de este tipo de casos, diversos grupos de investigadores comienzan a estudiar la posibilidad de una transmisión sexual. Una revisión sistemática encuentra 18 casos de transmisión persona-persona por medio de la vía sexual (Moreira et al., 2017). Posteriormente comienzan a hacerse estudios sobre el ZIKV en el aparato reproductivo del ratón, en este caso se encuentra que la infección ocurre en diversas células incluyendo espermatogonias, espermatoцитos primarios, células de Sertoli, células mioides peritubulares, células de Leydig y células del lumen epitelial (Govero et al., 2016). Los receptores identificados en la susceptibilidad al virus ZIKV de estas células son los receptores AXL, DC-SIGN, TIM-1 y TYRO-3 (Sakkas et al., 2018). La susceptibilidad se define como la presencia de elementos en la membrana celular, como receptores, que permiten y facilitan la entrada del virus, mientras que la permisividad se refiere a la capacidad de la célula hospedera para permitir la replicación de partículas virales en su interior (Flint et al., 2020).

Un estudio realizado en 295 pacientes humanos demuestra que el ARN del ZIKV puede encontrarse en semen humano hasta 191 días posteriores al inicio de la infección (Paz-Bailey et al., 2018), así mismo, otro estudio demuestra que, en moco cervical, la presencia del virus es detectable hasta 11 días después del inicio de los síntomas, este estudio es muy importante, pues es el primero en demostrar la presencia del virus en moco cervical (Prisant et al., 2016).

1.3 Fiebre de Zika

Fiebre de Zika es el nombre que se le otorga a la enfermedad causada por el ZIKV. Sus síntomas son muy similares a los de otros flavivirus como el virus del dengue. Se caracteriza por presentar fiebre mayor a 38°C, dolor articular y muscular, conjuntivitis, cefalea, dolor retro orbital y en algunos casos una erupción macular o papular (Slon Campos et al., 2018). Generalmente los síntomas inician entre los 3 y 15 días después de la infección y suele resolverse entre 2 y 7 días (Brasil et al., 2016; Song et al., 2017).

1.4 Complicaciones por la fiebre de Zika

Como se menciona anteriormente, la microcefalia y el SGB son las complicaciones más graves de esta infección. La microcefalia es una enfermedad neurológica congénita donde la circunferencia del cráneo del bebé a las 24 horas de nacido es significativamente más pequeña a la esperada comparándolo con bebés de la misma edad gestacional y sexo (H.-L. Chen & Tang, 2016), especialmente si la circunferencia se encuentra más de 2 desviaciones estándar (SD) por debajo de la media; si el perímetro se encuentra por debajo de 3 SD se considera microcefalia grave (Cauchemez et al., 2016).

La microcefalia comienza a detectarse especialmente durante el brote de ZIKV en Brasil en el año 2016 (Schuler-Faccini et al., 2016). Esta patología condiciona no solo una

baja calidad y expectativa de vida, sino que afecta a las familias de dichos pacientes por igual, al necesitar de mayores recursos para su cuidado, disminuyendo así su propia calidad de vida (Conceição-Santos et al., 2021).

La otra complicación muy importante, especialmente en adultos previamente sanos, es el SGB. Este síndrome, básicamente, es una respuesta autoinmune aberrante secundaria a la ingesta de un medicamento o una infección, donde dicha respuesta se dirige a los nervios periféricos y las raíces nerviosas. Es potencialmente mortal puesto que es progresiva y produce una debilidad simétrica desde las extremidades inferiores de forma ascendente (Pérez-Cabezas et al., 2019). Esto sucede por el mimetismo molecular de antígenos transportados por patógenos, que conduce a la generación de anticuerpos cruzados que también atacan los gangliósidos del sistema nervioso (van den Berg et al., 2014). Fundamentalmente los casos de SGB secundarios a infección por ZIKV se presentan como *neuropatía axonal motora aguda* y *polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda* (Parra et al., 2016).

1.5 Agente etiológico

1.5.1 Genoma del virus de Zika

El virus de Zika es un flavivirus cuyo genoma está formado por una molécula de ARN de cadena sencilla de sentido positivo con un tamaño aproximado de 11 kb. Tiene un marco de lectura abierto que codifica para una sola poliproteína de 3400 aminoácidos flanqueado por dos regiones no codificantes ubicadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral, no contiene cola de poli-A pero termina con un dinucleótido CU_{OH} conservado que tiene las mismas funciones. La poliproteína codificada por el único marco de lectura abierto es escindida por

proteasas celulares y virales en tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C), la proteína de premembrana/membrana (prM/M) y la de envoltura (E); así como siete proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Flint et al., 2020).

1.5.2 Proteínas estructurales y no estructurales

Tres proteínas estructurales le confieren al virión sus propiedades físicas; la proteína C se asocia con el ARN genómico para formar la nucleocápside de los viriones; la proteína E media la unión de los receptores celulares con el virus y promueve la fusión de los viriones con la membrana del endosoma durante la entrada del virus; la función de prM es ayudar al plegamiento de la proteína E como una chaperona y evita la fusión prematura de las partículas virales antes de ser exocitadas. La escisión de la proteína prM en proteína M es lo que se conoce como maduración de los viriones, lo cual permite la obtención de partículas infecciosas (Velandia & Castellanos, 2011).

Por su parte, las proteínas no estructurales tienen funciones vitales en el ciclo replicativo del virus. NS1 forma dímeros o hexámeros asociados con balsas lipídicas, puede encontrarse soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular y se han encontrado anticuerpos contra esta proteína, por lo que se asume que tiene un importante papel en la activación del sistema inmunitario (Chen et al., 2018).

La NS2A promueve el ensamblaje y la replicación viral, mientras que NS2B posee una región hidrofóbica que ancla el complejo NS2B/NS3 a la membrana del retículo endoplásmico, donde posteriormente tiene lugar un proceso proteolítico, en el que un dominio de NS2B interactúa con el dominio de proteasa de la proteína NS3 para actuar como su cofactor (Luo et al., 2015).

La proteína NS3 es una proteína multifuncional, tiene un dominio de proteasa similar a la tripsina (NS3pro), un dominio que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por ARN (NTPasa) y como helicasa de ARN (NS3Hel); funciones clave para la replicación viral. El dominio NS3pro hidroliza los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 en el polipéptido, por lo que es un factor muy importante en el ciclo replicativo viral. NS3 participa también en el ensamble y transporte de proteínas virales. Su función como helicasa es desenrollar las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del ARN viral, lo que favorece la unión de la proteína NS5 (polimerasa) sobre el ARN para iniciar la síntesis de nuevo ARN viral (Velandia & Castellanos, 2011).

La proteína NS4A tiene un papel importante en la remodelación de la membrana, antagoniza la respuesta de interferón, puede llegar a inducir la autofagia y participa en la replicación del virus (Klaitong & Smith, 2021). NS4B es una proteína transmembranal responsable del anclaje de los complementos de replicación, y parece ser un muy eficiente evasor de la respuesta inmunitaria (Zmurko et al., 2015).

Por su parte, la proteína NS5 es una proteína multifuncional, que posee una actividad enzimática en su extremo N-terminal de metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables de añadir la caperuza (*capping*) y de la metilación del extremo 5' del genoma, mientras que en el extremo C-terminal se ubica el dominio de ARN polimerasa dependiente ARN (RdRp) (Bollati et al., 2010).

1.6 Ingreso a la célula

Se conocen diferentes mecanismos por los cuales el virus puede ingresar en la célula y se sabe también que puede haber más de un receptor involucrado (Meertens et al., 2012). Durante este proceso la proteína E tiene una función vital, ya que induce la fusión de la membrana viral con la membrana celular, principalmente por receptores de lectina tipo C, el más importante de ellos es DC-SIGN (molécula de adhesión intracelular 3 no asociado a integrina, específica de células dendríticas) (Agrelli et al., 2019). Este es un receptor dependiente de calcio con un solo dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), también conocido como CD209, su función fisiológica conservada es la de mediar la adhesión célula-célula principalmente en células dendríticas (Rahimi, 2020).

Se conoce también la interacción del ZIKV con otros tipos de receptores de lectina tipo C como por ejemplo el receptor de manosa (MMR), el cual es dependiente de calcio, con múltiples CRD. Se desconoce si ZIKV tiene interacción con L-SIGN (molécula de adhesión intracelular 3 asociada a integrina específica de hígado/nódulo linfático) o a CLEC5A (Dominio de lectina tipo C que contiene 5A) puesto que no se han logrado identificar sus interacciones, pero se sabe que lo hacen con otras especies de flavivirus. La función específica de estos receptores no es bien conocida, pero se sabe tienen una función fagocítica y endocítica en macrófagos y otras células (Chen et al., 2012).

Por otro lado, los receptores transmembranales de fosfatidilserina tienen un papel importante en el ingreso del virus en la célula hospedera. Estos receptores pertenecen a dos familias: TIM (inmunoglobulina de células T y dominio de mucina) y TAM (por la abreviatura de sus miembros Tyro3, AXL y MER). El proceso de entrada por medio de estos receptores depende de la carga negativa de los viriones, los cuales, al emerger del retículo endoplásmico, adquieren su composición membranal con fosfatidilserina en su cara interna

(Lee et al., 2013). Ambos receptores normalmente participan en la fagocitosis dependiente de fosfatidilserina y la apoptosis celular (Meertens et al., 2012).

Se conocen otros mecanismos importantes que permiten que el virión se quede adherido a la superficie celular hasta que haya interacción con el receptor. Los más conocidos y estudiados son los glicosaminoglicanos de carga negativa (GAG) como el heparán sulfato y el condroitín sulfato, los cuales se unen al virión electrostáticamente, sin embargo, su función es crear complejos ligando/receptor lo cual les confiere una unión poco específica (Kim et al., 2017).

Otra forma de infectar las células por parte de los flavivirus es por un proceso denominado potenciación de la infección mediada por anticuerpo (ADE, por sus siglas en inglés). En la superficie de ciertas poblaciones celulares como los macrófagos o las células dendríticas existen receptores de la fracción Fc de inmunoglobulinas, los cuales son reconocidos por anticuerpos generados en infecciones heterotípicas previas. En el caso de los virus del dengue y de Zika se ha demostrado que algunos anticuerpos IgG no neutralizantes que han sido generados por una infección previa pueden favorecer la infección de células que expresan en su superficie los receptores para Fc gamma (FcγR), los cuales son vitales para inducir la fagocitosis de viriones opsonizados. Esta interacción es utilizada por el virión para infectar la célula e inducir una producción de viriones mayor que cuando los virus ingresan solamente por la vía de los receptores virales mencionados previamente (Taylor et al., 2015).

Una vez que el virión se ha acoplado con un receptor, se sugiere que es transportado o rodado a un foso o surco recubierto de clatrina, donde finalmente es endocitado por medio de la invaginación de este surco para crear un endosoma donde el virión continuará su ciclo replicativo (Taylor et al., 2015).

1.7 Ciclo replicativo

La replicación del ZIKV es similar al de otros flavivirus, el virus penetra en la célula a través de un endosoma primario, posteriormente se convierte en secundario y se combina con un lisosoma, lo que propicia un pH ácido que favorece la liberación del genoma en el citoplasma (Klaitong & Smith, 2021). El genoma del ZIKV actúa como ARN mensajero, por lo que la traducción de las proteínas se inicia inmediatamente después de la liberación del genoma en el citoplasma; la porción N-terminal de la poliproteína naciente contiene una señal de localización hacia el retículo endoplásmico que posteriormente es escindida por proteasas celulares y virales (Loza-Lay, 2019) (**figura 3**).

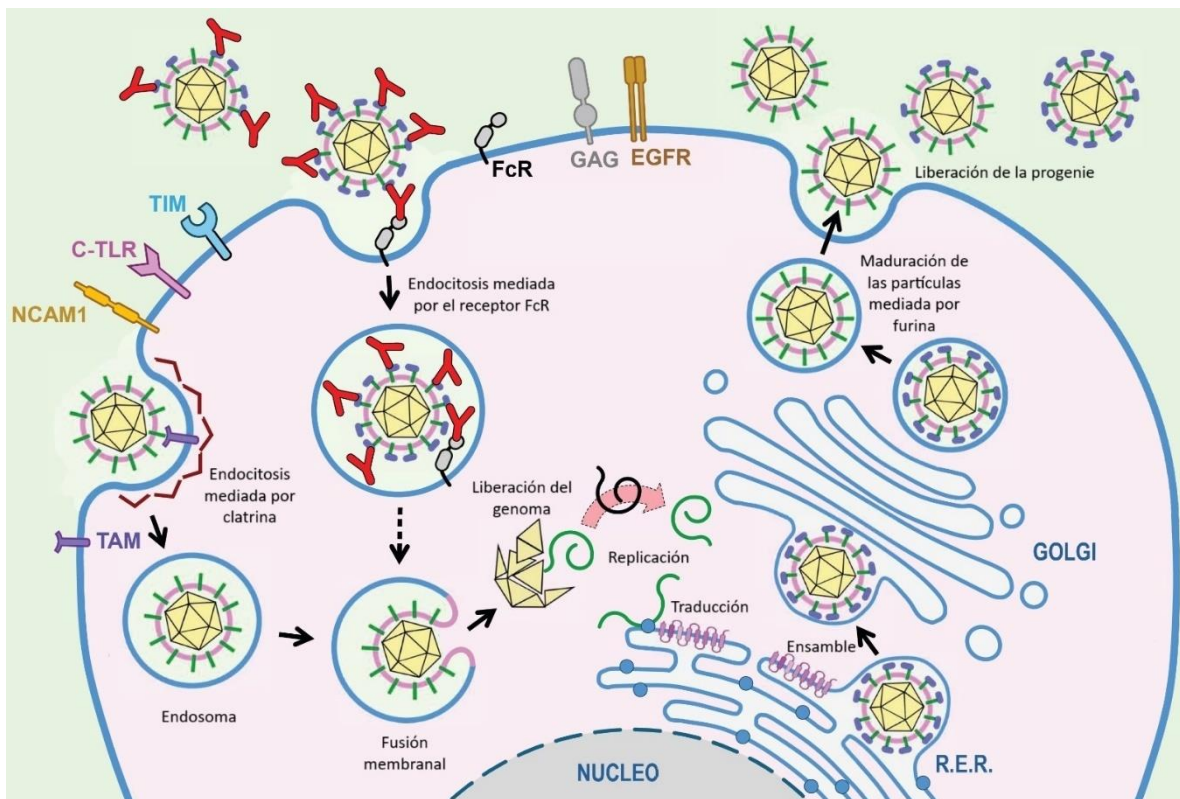


Figura 3. Ciclo de replicación del genoma del virus de Zika. El virus de Zika utiliza factores de adhesión como los glicosaminoglicanos (GAG) y puede utilizar diversos receptores de fosfatidilserina como (TIM) y (TAM), moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas (NCAM), receptores de lectina tipo C(C-TLR) y el receptor de factor de

crecimiento endotelial (EGFR), entre otros, para ingresar a la célula por medio de la endocitosis mediada por clatrina, así mismo puede utilizar el receptor de la fracción cristalizable (FcR)para ingresar por endocitosis mediada por receptor. Una vez adentro del endosoma se lleva a cabo la fusión membranal, donde el genoma es liberado al citosol donde se replica y migra al retículo endoplásmico rugoso (R.E.R) donde es traducido. En el R.E.R. los viriones son reensamblados y, utilizando la red trans-Golgi, son madurados por medio de la acción de la proteasa furina y finalmente exocitados de la célula (Flint et al., 2020).

Una vez en el retículo endoplásmico y tras el procesamiento de la poliproteína, el genoma se replica en la membrana del retículo endoplásmico con ayuda de las proteínas no estructurales y se forma un complejo de replicación: primero, NS5 (ARN polimerasa dependiente de ARN) copia el ARN genómico (positivo de cadena sencilla) a una molécula de cadena doble, posteriormente NS3 (actividad de helicasa) desenrolla y remodela el ARN de doble cadena en hebras de ARN de cadena sencilla con sentido positivo y negativo por separado. Así, la cadena sencilla con sentido negativo servirá de molde para sintetizar más ARN de sentido positivo. Las cadenas sencillas con sentido positivo son metiladas gracias a NS5 (metiltransferasa de su extremo N-terminal), mientras que la cadena negativa seguirá sirviendo como molde (Velandia & Castellanos, 2011).

Las moléculas de ARN de cadena sencilla en sentido positivo metilado se ensamblan junto con las proteínas estructurales C, E y prM para formar viriones inmaduros en el retículo endoplásmico. Una vez ensamblados, salen del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi, el cual transporta los viriones a la superficie celular; durante este proceso, el pH bajo de las vesículas favorece la reorganización del heterodímero E-prM a homodímeros de E en forma paralela a la superficie, lo que permite la escisión de prM por la furina (proteasa de la célula hospedera), lo cual induce la maduración completa del virión, que posteriormente es exocitado (Flint et al., 2020).

Sin embargo, en algunas ocasiones esta escisión no se lleva a cabo de forma completa, lo cual permite la exocitosis de viriones inmaduros o parcialmente maduros, los cuales también tienen un papel importante en la unión a otros receptores celulares debido a su interacción con anticuerpos neutralizantes, los cuales en concentraciones no neutralizantes pueden permitir la infección (Knipe & Whelan, 2020).

Para permitir que la replicación se lleve a cabo, se ha demostrado que las interacciones ARN-ARN de largo alcance son de suma importancia, lo que permite la circularización del genoma viral y el posicionamiento de la ARN polimerasa dependiente de ARN cerca del sitio de inicio de la transcripción (Huber et al., 2019). Este proceso de circularización se lleva a cabo en todos los flavivirus y requiere de los extremos no codificantes del genoma. Las regiones 5' UTR de los genomas de flavivirus están altamente estructuradas, con tres regiones principales conservadas: el bucle de tallo A (SLA), el bucle de tallo B (SLB) y una horquilla corta en la región de codificación de la cápside (cHP). Como se menciona anteriormente, el genoma de los flavivirus generalmente se circulariza mediante interacciones de ARN-ARN a larga distancia entre elementos en los extremos 5' y 3'. Estos están compuestos por la región río arriba del AUG (UAR por sus siglas en inglés), la región río abajo del AUG (DAR por sus siglas en inglés) y la secuencia de ciclación (CS por sus siglas en inglés) como se muestra en la **(figura 4)** (Sanford et al., 2019).

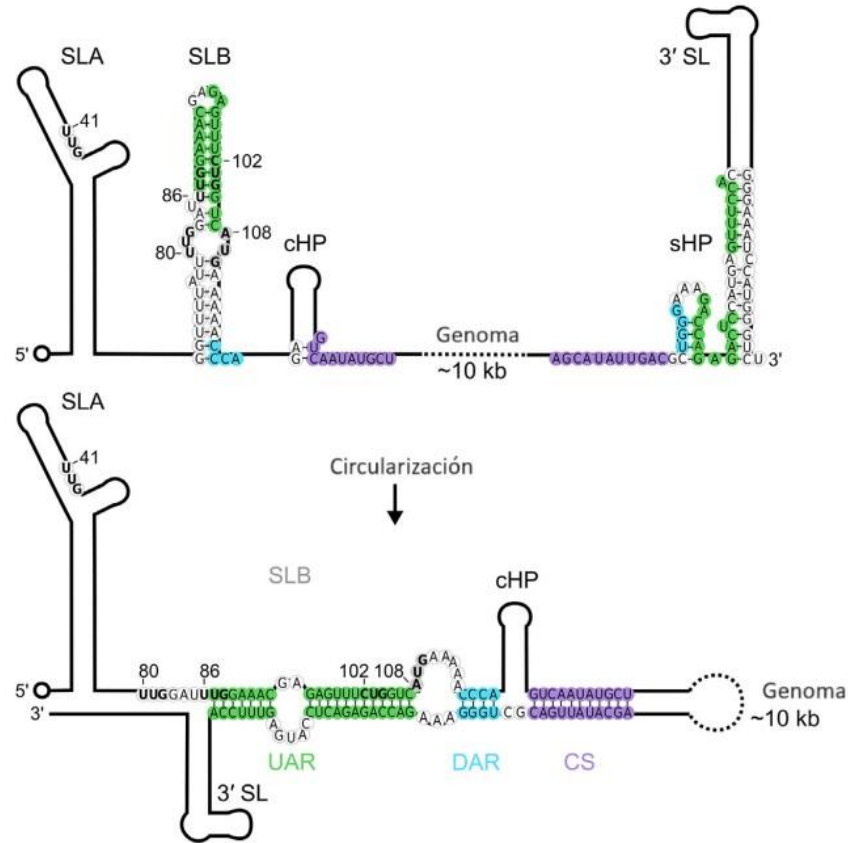


Figura 4. Circularización de los flavivirus. Se muestran los esquemas lineales (arriba) y circulares (abajo). Los nucleótidos pertenecientes a las regiones UAR, DAR y CS se muestran en verde, azul y morado, respectivamente. El iniciador AUG y los codones cercanos al iniciador están en negritas. Tomado y modificado de Sanford et al., 2017.

Dado que el elemento UAR 5' forma la mayor parte de SLB en la conformación lineal, la circularización del genoma implica la disolución de esta estructura en favor de la formación de un dúplex con el extremo 3'. Este proceso es esencial para la replicación del genoma viral, ya que la NS5 polimerasa viral se recluta en SLA en la 5' UTR antes de interactuar con el extremo 3' para iniciar la síntesis de la cadena negativa, facilitada por la proximidad de los dos extremos genómicos en la forma circularizada (**figura 5**).

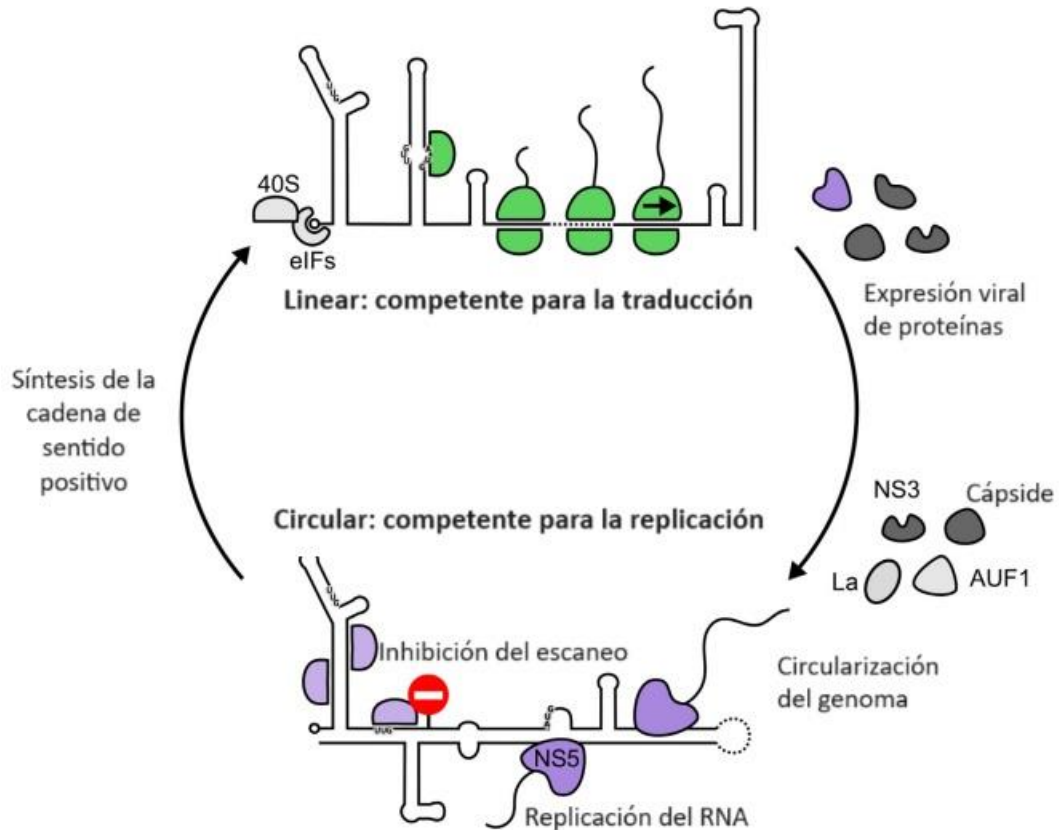


Figura 5. Modelo para el control de la iniciación de la traducción mediante la circularización del genoma. El ARN genómico lineal recluta factores de inicio de la traducción (eIFs) y subunidades ribosomales 40S (gris claro) de manera dependiente del cap. La estructura secundaria en la UTR 5' es desenrollada por la helicasa eIF4A para permitir el inicio de la traducción desde el codón de inicio auténtico, indicado por un complejo 48S verde. Después de la circularización del genoma, promovida por factores virales y del hospedero, y que probablemente ocurre en la membrana del RE, los ribosomas están obstaculizados por la extensa estructura del ARN formada por la hibridación de los elementos de ciclización 5' y 3'. La disminución de la traducción desde el AUG auténtico permite la replicación eficiente del genoma por la NS5pol (morado). Tomado y modificado de Sanford et al., 2017.

2. ANTECEDENTES GENERALES

Como se mencionó anteriormente, se tienen identificadas varias moléculas de la célula hospedera que sirven como receptores o factores de adhesión para los flavivirus. Entre los primeros encontramos la molécula DC-SIGN, y las proteínas de las familias TIM y TAM, entre otros. Para los segundos, destacan los glucosaminoglicanos dentro de los cuales se

encuentra el heparán sulfato. Sin embargo, no son los únicos receptores que se han identificado. Estudios más recientes se han centrado en la interacción del virus con diferentes receptores tanto humanos como de mosquito, lo que podría ayudar a explicar su gran tropismo celular.

2.1 Reproducción del vector

El vector principal del ZIKV es el mosquito de la especie *Aedes aegypti*, el cual se considera un insecto holometábolo, es decir, que pasan por una metamorfosis completa desde la etapa de huevo, larva, pupa y adulto. Las fases de larva y pupa son acuáticas, mientras que los huevos y los adultos son de fase terrestre. Su vida adulta suele durar dos semanas dependiendo del ambiente y el ciclo completo de vida suele durar entre 8 y 10 días a temperatura ambiente (Sobhia et al., 2019) (**figura 6**).

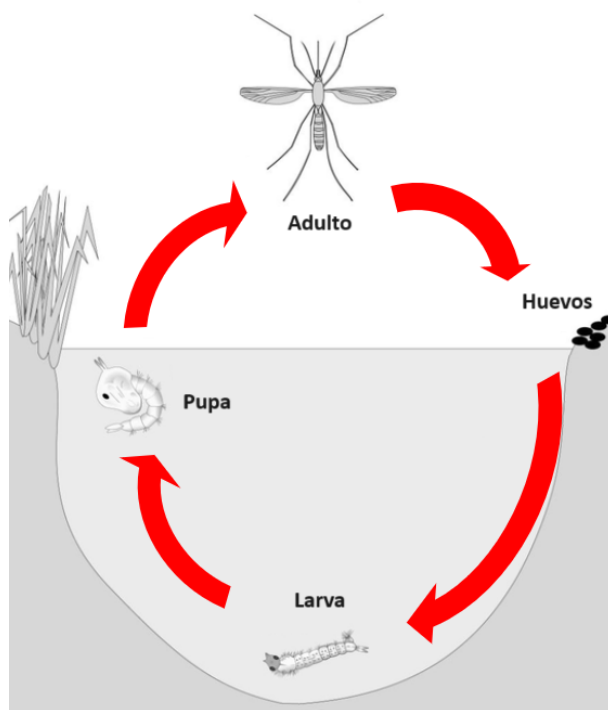


Figura 6. Ciclo de vida del mosquito. Esquema de las cuatro fases del ciclo de vida del mosquito. Tomado y modificado de Stanczyk, 2011.

2.2 Interacción de los receptores del mosquito con el virus de Zika

Comprender la interacción viral con las células de mosquito es crucial para entender los mecanismos del virus en su interacción con los receptores celulares humanos. Este conocimiento constituye la base para desarrollar una comprensión integral de la patogenicidad y la dinámica de transmisión del virus.

Un estudio realizado por Cui y Franz (2020) mostró que el intestino medio de la hembra del mosquito es el sitio inicial de infección por ZIKV. El estudio identificó seis tipos celulares distintos: células madre, enteroblastos, enteroblastos en diferenciación, células enteroendocrinas, enterocitos (EC), células tipo EC, células del cardias y células de músculo visceral. Al alimentarse, los viriones ingresan a las células epiteliales del intestino medio mediante endocitosis mediada por receptores, similar al proceso observado en humanos. Para la transmisión por su vector mosquito, el arbovirus debe infectar las células epiteliales del intestino medio, replicarse, diseminarse y finalmente infectar las glándulas salivales (Salazar et al., 2007).

Aunque los receptores específicos en el intestino medio del mosquito que interactúan directamente con el virus de Zika siguen siendo en gran medida desconocidos, las lectinas tipo C del mosquito (mosGCTLs) son los principales candidatos. En 2014, Liu y colaboradores identificaron y nombraron la lectina tipo C específica de galactosa-1 del mosquito (mosGCTL-1), que facilitaba la adhesión del virus de West Nile (WNV) a la membrana celular (Liu et al., 2014). Es fundamental realizar una investigación exhaustiva para desentrañar los mecanismos de entrada del virus de Zika en las células del intestino medio del mosquito y para investigar posibles paralelismos en sus interacciones con las células humanas.

2.3 Interacción de los receptores humanos con el virus de Zika

2.3.1 Receptores de fosfatidilserina TYRO-3, AXL, TIM-1 (receptores TAM)

Los receptores de fosfatidilserina son proteínas integrales de membrana esenciales para la señalización celular, la apoptosis y la regulación de la respuesta inmunitaria. Los receptores TYRO-3, AXL y TIM-1 pertenecen a la familia TAM, están distribuidos en diversos tejidos, y son especialmente abundantes en el sistema inmunológico (Hsu et al., 2019). TYRO-3 es abundante en el cerebro y los testículos, apoyando la función sináptica y la espermatogénesis. AXL se expresa ampliamente en el organismo, particularmente en el endotelio vascular y las células mieloides, lo que facilita la fagocitosis de células apoptóticas y media la respuesta inmune (C. Zhu et al., 2019). TIM-1 se encuentra en células epiteliales y está involucrado en la infección hepática por el virus del dengue, regula las respuestas de células T y actúa como receptor de fosfatidilserina en infecciones virales (Kondratowicz et al., 2011). Estos 3 receptores mencionados son cruciales para la entrada del virus de Zika en las células, lo cual facilita su infecciosidad y replicación. La fosfatidilserina en la superficie del virus, adquirida durante la exocitosis de los viriones, puede inducir un estado antiinflamatorio e inmunosupresor para permitir que el virus persista y se propague sin ser eliminado por el sistema inmunológico. AXL y TIM-1 se han implicado en la entrada del virus de Zika y otros flavivirus en las células, lo que influye en la diseminación viral y la evasión inmune (Bohan & Maury, 2021).

2.3.2 Receptores de lectina tipo-C DC-SIGN (CD209) y CLEC5A

Los receptores de lectina tipo C son una gran familia de proteínas reconocidas por su capacidad para identificar patrones de carbohidratos en patógenos que desempeñan un papel crucial en la defensa inicial del sistema inmunológico. DC-SIGN (CD209), expresado

prominentemente en células dendríticas, facilita la captación de antígenos para su presentación a las células T (Geijtenbeek et al., 2000). CLEC5A, presente en células mieloides como macrófagos y monocitos, participa en la respuesta inflamatoria a infecciones virales (S. T. Chen et al., 2008). DC-SIGN puede unirse a glicanos de alta manosa de diferentes virus, lo que potencia la infección en células dendríticas y promueve la evasión del sistema inmunológico (Lozach et al., 2004). Menechino y colaboradores (2023) realizaron estudios *in silico* de la interacción de la proteína E de ZIKV y DENV con DC-SIGN, además de que demostraron que la infección puede bloquearse con anticuerpos específicos. CLEC5A puede reconocer y unirse a los virus del dengue y de Zika y desencadenar las vías de señalización que llevan a la secreción de citocinas proinflamatorias. Se ha demostrado en ratones que la ausencia de CLEC5A reduce la infectiosidad y el daño tisular del ZIKV, lo que indica su papel mediador en la infectividad y daño del ZIKV (Chen et al., 2012).

2.3.3 Moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) NCAM1.

Estas moléculas abarcan un grupo diverso de proteínas involucradas en el reconocimiento célula-célula, adhesión y señalización en el sistema nervioso (Stoeckli, 2004). NCAM1, o molécula de adhesión celular neural 1, está altamente expresada en el sistema nervioso y juega un papel crítico en el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica y la regeneración (Vukojevic et al., 2020). Aunque la interacción entre NCAM1 y el ZIKV está mucho menos estudiada en comparación con otros receptores, se cree que, dado el papel crucial de NCAM1 en el desarrollo neuronal, su interacción con el ZIKV podría contribuir a la patogénesis en tejido nervioso. El virus podría explotar las vías mediadas por NCAM1 para afectar la

neurogénesis y el desarrollo cerebral, lo que potencialmente conduce a los defectos neurológicos observados en el síndrome del virus Zika. Srivastava et al. utilizaron un enfoque proteómico en el que se etiqueta la superficie del ZIKV con una sonda química con fotocruzadores; la sobreexpresión de NCAM1 en células HEK 297T aumentó la unión y entrada viral, mientras que el silenciamiento de NCAM1 en células U-251 MG inhibió notablemente la infección por ZIKV (Srivastava et al., 2020).

2.3.4 Integrina $\alpha V\beta 5$

La integrina $\alpha V\beta 5$ es un receptor perteneciente a la familia de proteínas heterodiméricas de las integrinas, que participan en diversos procesos celulares, incluyendo la adhesión, señalización y supervivencia celular. Se expresa en una amplia variedad de tipos celulares y es particularmente abundante en células epiteliales y endoteliales vasculares, donde juega un papel significativo en la mediación de la adhesión celular a la matriz extracelular (Schiesser et al., 2021). La integrina $\alpha V\beta 5$ regula la migración, proliferación y diferenciación celular, especialmente durante la remodelación y reparación tisular. Además, está implicada en la internalización de virus y otros patógenos a través de la endocitosis, sirviendo como punto de entrada celular (Summerford et al., 1999). La interacción entre la integrina $\alpha V\beta 5$ y el virus de Zika (ZIKV) ha sido examinada en el contexto de la patogénesis viral. Esta integrina facilita la adhesión y entrada del ZIKV en las células al unirse a las proteínas de la envoltura del virus, lo que facilita la fusión y entrada del virus en el citoplasma de la célula huésped. Wang y colaboradores (2020) demostraron esta interacción mediante una serie de mutaciones de inactivación de genes con CRISPR, seguido de ensayos de unión e internalización del virus, ELISA, análisis de fosforilación de FAK, y estudios de inhibición con anticuerpos bloqueantes, cilengitide y SB273005, lo cual logró reducir exitosamente la infección por

ZIKV en células troncales neurales humanas y en cerebros de ratones. El papel de la integrina $\alpha V\beta 5$ en la infección por ZIKV resalta la explotación del virus de la maquinaria celular del hospedero para establecer la infección, presenta posibles objetivos para la intervención terapéutica para prevenir o mitigar la infección por ZIKV y sus consecuencias asociadas (Tan et al., 2022; Z..., 2020).

2.3.5 Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAG), también conocidos como mucopolisacáridos, son moléculas de polisacáridos lineales cargadas negativamente presentes en la superficie celular y dentro de la matriz extracelular (Afratis et al., 2012). Dentro de este grupo, se incluyen diversos tipos como el sulfato de heparán, el sulfato de condroitina, el sulfato de dermatan, el ácido hialurónico y el sulfato de queratán, cada uno con funciones y distribuciones particulares (cita).

Se ha demostrado que el sulfato de heparán, un tipo de GAG presente en la superficie celular juega un papel clave en la interacción del ZIKV con las células hospederas Tang et al. (2016) evidenciaron esta interacción al infectar con éxito células progenitoras neuronales corticales humanas (hNPC) con el virus y realizar ensayos de inhibición con heparina y heparinasa, lo que confirma que el sulfato de heparán es crucial para el proceso de entrada del virus. Asimismo, Pereira et al. (2020) describieron que la proteína de la envoltura del ZIKV se une al sulfato de heparán, concentrando el virus en la superficie celular y facilitando su entrada.

Aunque la investigación sobre otros tipos de GAG en la infección por ZIKV es más limitada, se piensa que estas moléculas pueden influir en la eficiencia de la infección y en la capacidad del virus para infectar una amplia gama de tipos celulares (Kim et al., 2017). Este

comportamiento podría deberse a la diversidad estructural de los GAG y su capacidad para interactuar con una variedad de ligandos, incluyendo factores de crecimiento, quimiocinas y virus.

2.3.6 Receptores tirosina-cinasa: EGFR

Las cinasas de receptor de tirosina (RTK), o receptores tirosina-cinasa, actúan como receptores de superficie celular de alta afinidad para varios factores de crecimiento polipeptídicos, citocinas y hormonas (Talukdar et al., 2020). Entre estos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se destaca como uno de los más estudiados, desempeña un papel crucial en el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular (Sabbah et al., 2020). El EGFR se expresa en diversos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, mesenquimales y neuronales, y está notablemente implicado en la biología del cáncer debido a su frecuente sobreexpresión o mutación en malignidades, contribuyendo en la división celular descontrolada y en el crecimiento tumoral (Bethune et al., 2010).

La posible interacción entre el virus de Zika y el EGFR es un área de interés emergente. Aunque el EGFR no se reconoce convencionalmente como un receptor viral, la evidencia sugiere que el ZIKV puede modular indirectamente las vías de señalización del EGFR para promover su replicación y propagación. El virus podría manipular la señalización mediada por el EGFR para atenuar las respuestas inmunitarias innatas, creando así un entorno propicio para su replicación. Sabino y colaboradores (2021), quienes estudiaron células A549 (positivas para EGFR en su membrana) y células CHO (negativas para EGFR en su superficie) descubrieron una clara diferencia en el número de genomas virales internalizados, mayor para células A549. Esto se confirma al aumentar la entrada viral en células CHO transfectadas con sobreexpresión de EGFR, mientras que las células A549 con EGFR

inactivado (generadas mediante CRISPR/Cas9) mostraron una disminución en la infección por ZIKV.

2.3.7 Receptores Fc gamma (FC γ R)

Los receptores Fc (FcRs) comprenden un grupo de moléculas presentes en la superficie de varias células inmunitarias, incluyendo linfocitos B, células asesinas naturales, macrófagos y mastocitos (Takai, 2002). Estos receptores se unen a la región Fc de los anticuerpos, facilitan la presentación de antígenos y participan en fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios. Entre ellos, FC γ R se une específicamente a los anticuerpos IgG y desempeña un papel crucial en la defensa inmune contra patógenos (Bournazos et al., 2020).

En el contexto de la infección por ZIKV, los receptores Fc pueden tener un doble papel, por un lado pueden promover el ADE (potenciación de la infección mediada por anticuerpos), especialmente preocupante con flavivirus como el ZIKV, donde concentraciones subneutralizantes de anticuerpos pueden aumentar la entrada viral en células portadoras de receptores Fc, lo cual exacerba la infección (Khandia et al., 2018) y por otro lado, son esenciales para la eliminación de células infectadas mediante mecanismos como la fagocitosis y la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Esto fue demostrado por Sapparapu y colaboradores (2016) quienes aislan células B de sujetos previamente infectados por ZIKV, generando hibridomas para producir anticuerpos monoclonales y los caracterizaron por su unión a la envoltura del virus, mapean los epítomos y realizan estudios *in vivo* en ratones. En sus resultados presentan varios anticuerpos monoclonales neutralizantes potentes, uno de ellos, ZIKV-117, que reduce significativamente la replicación del ZIKV, la patología tisular y la mortalidad en ratones.

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

3.1 Interacción del virus de Zika con receptores del tracto genitourinario femenino

Poco ha sido estudiado sobre la interacción del ZIKV con células específicas del tracto genitourinario femenino, a pesar de sus graves consecuencias en mujeres embarazadas. Un artículo de 2019 menciona el caso de una mujer brasileña de 39 años que inicia con síntomas de Zika como fiebre, y es hospitalizada en el día 6 de la enfermedad. Su esposo no presenta síntomas y niega haber tenido contacto sexual durante la enfermedad o en los días previos al inicio de los síntomas. Al ingreso al hospital se confirma la presencia de ZIKV por RT-PCR y ELISA. Se toman muestras vaginales y endocervicales los días 31 y 54, sin embargo, la presencia del virus se detectó únicamente en la muestra del día 31 (Da Cruz et al., 2019). Este artículo solo describe el caso clínico y muestra la presencia del virus en muestras vaginales en el día 31 sin mencionar algún receptor celular específico involucrado.

Otro artículo explora los mecanismos de control inmunológico en el tracto reproductor femenino frente al ZIKV. Los investigadores utilizan células epiteliales vaginales (HVEC) y cervicales (HCEC) humanas tratadas con interferón β y λ , sus resultados demostraron que el tratamiento con interferón es eficiente en la reducción de la infección por ZIKV, por lo que se hipotetiza que el IFN- λ de tipo III es una citocina antiviral que funciona en las superficies de barrera y se induce río abajo de la detección del receptor de reconocimiento de patógenos y la activación de la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS). El IFN- λ se une y señala a través de receptores heterodiméricos expresados selectivamente (Ifnlr1/Il10r β), lo que lo distingue de los IFN de tipo I que se unen a los heterodímeros Ifnar1/Ifnar2, que se expresan de manera más amplia. El IFN- λ tiene

funciones antivirales contra el ZIKV en el contexto de la infección de la decidua endometrial derivada de la madre y la placenta derivada del feto durante el embarazo en ratones y humanos (Caine et al., 2019).

Una revisión sistemática de estudios *in vivo* realizada por Morelli y colaboradores en 2020, proporciona conocimiento actual sobre las infecciones por el virus de Zika en el tracto genital femenino de mujeres no embarazadas, animales y cultivos celulares. Así mismo destaca la investigación de Hastings y colaboradores (2017) sobre los receptores TAM en ratones, quienes demostraron que no son necesarios en la infección por ZIKV. Por otra parte, menciona el importante hallazgo de Pagani y colaboradores (2017), donde se demostró que las células estromales endoteliales son altamente permisivas a la infección por el ZIKV debido a la presencia del receptor AXL en su superficie, y teorizaron que es posible que dicho receptor sea regulado por estrógeno y progesterona. Esta revisión concluye que hay un consenso de la presencia del ZIKV en el tracto genital femenino, en pacientes convalecientes y que, a veces, su presencia puede llegar a presentarse por periodos largos, aún eliminados de sangre y orina.

En cuanto al estudio del ZIKV en la línea celular C33-A (células de cuello uterino humano), las cuales son las células problema usadas en esta tesis, de Souza y colaboradores (2020) realizaron un estudio donde infectaron diversas líneas celulares de cérvix y placenta humanas y las trataron con cloroquina y sulfadoxina. Las conclusiones presentadas por el grupo de investigación expresaron que la cloroquina y la sulfadoxina interfieren en la replicación viral mediante la alteración del pH de los endosomas y lisosomas en células C33-A, lo que sugiere su potencial como tratamiento antiviral contra el ZIKV, sin embargo, no menciona algún estudio sobre receptores en esta línea celular. Otro estudio sugiere,

mediante ensayos *in-vitro* que la Nitazoxanida inhibe la glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico, lo cual es crítico para la maduración de proteínas virales (Li et al., 2017).

3.2 Estudio de los receptores TIM y TAM en la línea celular de riñón de hámster neonato (BHK-21)

Nuestro grupo de trabajo determina la permisividad de la línea celular de riñón de hámster neonato (BHK-21) mediante infecciones a distintas dosis de virus del virus de Zika, posteriormente se realiza la identificación de los receptores TIM-1, TYRO-3 y AXL en la superficie de las células y se comprueba la especificidad de los receptores por medio de ensayos de inhibición. La técnica utilizada para la inhibición de los receptores consiste en el bloqueo específico mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la superficie de las células BHK-21. Los anticuerpos se incuban con las células antes de la infección con el virus de Zika, con el objetivo de impedir la interacción entre el virus y los receptores. Los métodos estandarizados y los resultados obtenidos en dicho trabajo permitieron el uso de células BHK-21 como control positivo en el presente trabajo (Loza-Lay, 2019).

4. JUSTIFICACIÓN

La fiebre por Zika se considera una enfermedad no grave, que generalmente cursa sin mayores complicaciones ni deja secuelas. Sin embargo, la aparición de cuadros clínicos como la microcefalia y el Síndrome de Guillain-Barré en adultos ha subrayado la necesidad de un mayor entendimiento de los mecanismos de infección y transmisión viral, especialmente en vías de importancia, como la transmisión sexual, donde aún existe poca investigación.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El contacto sexual se ha considerado uno de los métodos de transmisión del virus de Zika; sin embargo, los mecanismos celulares implicados en esta infección no están bien estudiados. Es fundamental profundizar en el conocimiento y entendimiento del virus de Zika y la enfermedad que causa, especialmente en cuanto al modo en que el virus ingresa a las células por la vía sexual. Por ello, en este proyecto investigamos el papel de las proteínas de superficie celular Tyro3, AXL y TIM-1 en la entrada del virus de Zika a las células del cuello uterino humano.

6. HIPOTESIS

Las células de cuello uterino poseen receptores en la superficie que están implicados en la infección por el virus de Zika.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Evaluar la presencia y el papel de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la interacción del virus de Zika con las células de cérvix uterino C33-A durante la infección.

7.1.1 Objetivos específicos

1. Evaluar la permisividad de la línea celular de cuello uterino C33-A a la infección por el virus de Zika.

2. Determinar si las proteínas Tyro3, AXL y TIM-1 se expresan en la superficie de células de cuello uterino C33-A.
3. Determinar si las proteínas Tyro3, AXL y TIM-1 están involucradas en la infección de células de cuello uterino C33-A por el virus de Zika mediante la inhibición de la infección por anticuerpos específicos contra dichas proteínas.

8. METODOLOGÍA

8.1 Cultivo celular

8.1.1 Células C6/36

La línea celular C6/36 (ATCC CRL-1660) es una línea de células adherentes derivadas de la larva del mosquito *Aedes albopictus*. Estas células son ampliamente utilizadas en la investigación virológica debido a su capacidad para permitir la replicación de una variedad de flavivirus, incluyendo el virus del dengue y el virus de Zika. En este experimento, las células C6/36 se cultivaron en el medio de cultivo MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) modificado, sin HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfónico) y sin bicarbonato de sodio, lo que permite mantener un control más preciso del pH en condiciones específicas. El medio se complementó con un 10% de suero fetal bovino (SFB) para proporcionar los nutrientes y factores de crecimiento necesarios. Las células fueron incubadas a 28° C sin suplementación de CO₂ y sin control de humedad.

8.1.2 Células BHK-21

La línea celular BHK-21 (ATCC CCL-10) proviene de células de riñón de hámster neonato (Baby Hamster Kidney), son células adherentes y pueden formar una monocapa. Dichas

células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de SFB e incubadas a 37°C y CO₂ al 5%.

8.1.3 Células C33-A

La línea celular C33-A (ATCC HTB-31) proviene de células de un carcinoma cervicouterino humano. Son células adherentes y forman una monocapa. Dichas células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 15% de SFB e incubadas a 37°C y CO₂ al 5%.

8.2 Cepa del virus de Zika

Se utilizó la cepa de virus de Zika (CIENI-551) donada por la Dra. Rosa María del Ángel (CINVESTAV). El virus fue obtenido de una muestra tomada a un paciente masculino de 80 años en la región del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México.

8.3 Propagación del virus de Zika

El virus de Zika se propagó en células C6/36 con una confluencia del 80-90%, cultivadas en MEM con 10% de SFB hasta observar un efecto citopático. El sobrenadante se recolectó y se hicieron en alícuotas de 300 µl que se conservaron a -70° C.

8.4 Titulación del virus de Zika

La titulación viral se realizó en placas de 6 pozos utilizando la línea celular BHK-21. Se tomaron dos botellas de 25 cm² de superficie al 100% de confluencia de células BHK-21, cada una se lavó dos veces con solución amortiguadora de cloruro de sodio y fosfatos (PBS) y se resuspendió en 4 ml de DMEM suplementado con 10% de SFB. La preparación se llevó hasta 8 ml con DMEM en un tubo de 50 ml. Se utilizó una cámara de Neubauer para contar la cantidad de células. A partir de este cultivo se colocaron 4.5×10^7 células en cada uno de

los seis pozos, es decir 1 ml de los 8 ml totales de células resuspendidas y se aforó cada pozo a 2 ml adicionando 1 ml de DMEM suplementado con 10% de SFB. Cada placa de 6 pozos se incubó durante 24 horas a 37° C y CO₂ al 5%. Los 2 ml restantes de la resuspensión celular se regresaron a la botella de cultivo para su mantenimiento.

Se prepararon diluciones seriadas del virus (factor 10) de la siguiente manera: en tubos de 1.5 ml se colocaron 630 µl de DMEM sin SFB. Al primer tubo se le añadieron 70 µl de sobrenadante obtenido en la propagación viral y se hicieron las diluciones seriadas hasta alcanzar la dilución -10, cada tubo con un volumen final de 700 µl.

Se retiró el medio de las placas de 6 pozos y se colocaron 600 µl de cada una de las diluciones seriadas junto con un control negativo y se dejaron incubar 1 hora a 37° C y CO₂ al 5% con agitación suave. Concluida la hora se retiró el inóculo viral y se adicionó una mezcla de agarosa y DMEM con SFB al 10% a cada pozo. Las placas se mantuvieron a 37° C y CO₂ al 5% durante 2 días.

A las 48 horas se fijó la monocapa de cada pozo con ácido tricloroacético al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 1.25% en etanol al 20%.

Las placas líticas se contaron y se utilizó la siguiente fórmula para determinar las unidades formadoras de placa sobre mililitro:

$$\text{UFP: } \frac{\text{\# de placas}}{\text{volumen de inóculo}} \times \text{inverso de la dilución}$$

8.5 Cinética de replicación viral

Utilizando cuatro botellas de 25 cm² de superficie con células BHK-21 a una confluencia del 80% se procedió a realizar la infección a diferentes MOI (multiplicidad de infección). La MOI se calcula de la siguiente manera: número de UFP / número de células en cultivo.

Una de las cuatro botellas se utilizó como control negativo de infección, las otras tres botellas se infectaron con las MOI 0.1, 0.01 y 0.001. Se dejaron incubar a 37° C y CO₂ al 5%, cada 12 horas se recolectaron 100 µl de sobrenadante de cada una de las cajas y se guardaron a -70° C. Se tomó evidencia fotográfica del cultivo celular mediante microscopía de contraste de fases (microscopio Nikon modelo ECLIPSE Ts2-FL) previo a cada toma para comparar el efecto citopático. El mismo procedimiento se realizó con células C33-A.

Posteriormente, las alícuotas recuperadas de sobrenadante se titularon mediante UFP y se hicieron gráficas en el programa GraphPad Prism 10 de título viral vs. tiempo post-infección.

8.6 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular C33-A

La determinación de la presencia del virus de Zika se realizó por medio de microscopía de fluorescencia mediante el uso de un anticuerpo monoclonal primario de ratón que reconoce la glicoproteína E del virus de dengue (Abcam, ab41349), el cual cruza antigénicamente con el virus de Zika. Primero se preparó la monocapa de células C33-A sobre cámaras-portaobjeto de 8 pocillos (Nunc Lab-Tek II, Thermo Scientific), se colocaron 2x10⁵ células por pozo, se aforaron a 100 µl cada uno y se dejaron incubar 24 horas a 37° C y CO₂ al 5%.

Al día siguiente se prepararon diluciones seriadas del virus de Zika (10⁻³ hasta 10⁻⁹, factor 10) en DMEM sin SFB y se añadieron las diluciones desde 10⁻³ a 10⁻⁹ con un control

negativo; se dejó adsorber durante 1 h. Posteriormente, se retiró el inóculo, se fijó la monocapa con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con PBS/ Triton X-100 (PBST) al 0.25%, se bloquearon con PBST/ albúmina sérica bovina (BSA) al 1%. Los cultivos se incubaron con el anticuerpo anti-E del virus del dengue a una dilución 1:300 durante toda la noche a 4° C. A la mañana siguiente se lavó con PBS, se adicionó el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón marcado con AFL 488 (Abcam, ab150113) a una dilución 1:1000 y se incubó durante 2 h. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen, H1399) a una dilución 1:1000, incubando a temperatura ambiente de 10 a 15 min. Al finalizar la incubación se colocó el cubreobjetos sobre la monocapa con 10 µl de PBS y se selló con barniz.

Se analizó la monocapa 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.

8.7 Identificación de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A

Una vez determinada la permisividad de la línea celular C33-A se procedió a identificar la presencia de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en dicha línea celular. Esto se realizó mediante la microscopía por inmunofluorescencia con el uso de anticuerpos específicos para cada uno de los receptores. Se utilizó la línea celular BHK-21 como control positivo de infección por el virus de Zika.

Tras realizar la estandarización del proceso de permisividad, se estandarizó también la dilución de anticuerpos necesaria para la visualización adecuada de cada uno de los receptores. Se colocaron 2×10^5 células por pozo, se aforaron a 100 μ l cada uno y se dejaron incubar 24 horas a 37° C y CO₂ al 5%.

La determinación de la presencia de las proteínas con probable función de receptor sobre las células sin infectar se llevó a cabo para confirmar su ubicación en la superficie celular. Tras 24 h, los cultivos celulares se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con PBS/ Triton X-100 al 0.25% y se bloquearon con PBST/ BSA al 1%. Se incubaron con los anticuerpos primarios: 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 1:500, 1:1000 y 1:1000, respectivamente. Posteriormente se aplicaron los segundos anticuerpos IgG de conejo contra ratón marcado con AFL 488 (Abcam, ab150113) a una dilución 1:1000 para TIM-1 y TYRO-3 y el anticuerpo IgG de burro contra cabra marcado con AFL 594 (Abcam, ab150132) para AXL. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen, H1399) a una dilución 1:1000, incubando a temperatura ambiente de 10 a 15 min, terminado el tiempo se colocó el cubreobjetos sobre la monocapa con 10 μ l de PBS en cada pozo y se selló con barniz.

Posteriormente, se realizó el mismo proceso para determinar la cinética de expresión de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 después de infectar las células con el virus de Zika a las 0, 12 y 24 horas con una MOI de 0.01 y 0.001; por lo tanto, a cada determinado tiempo se fijaron y tiñeron las monocapas. Se utilizó un microscopio invertido Zeiss Axio Observer A2 con epifluorescencia y sistema de seccionamiento óptico (Zeiss Apotome 2) para analizar la monocapa.

La intensidad de fluorescencia se mide en unidades de fluorescencia relativa por micrómetro cuadrado (UFR/ μm^2), y el análisis se lleva a cabo con el software Zeiss Zen 3.8. Posteriormente la información recopilada se grafica y analiza en el programa GraphPad Prism 10

8.8 Bloqueo de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A

Para verificar la funcionalidad como receptor para el virus de Zika de cada una de las proteínas estudiadas se procedió a sembrar 80 mil células en cada uno de los pozos en una cámara-portaobjeto de 8 pozos con DMEM y complementado con SFB al 15%, Cada pozo se aforó a 100 μl y se dejaron incubar 24 horas a 37° C y CO₂ al 5%. Transcurrido el tiempo se colocaron 100 μl de anticuerpos (anti-AXL, anti-TIM1 y anti-TYRO3) a las concentraciones 1:200 para el primero y 1:500 para los últimos dos durante 1 hora. Posteriormente se realizaron lavados y se procedió a infectar las monocapas a las MOI 0.01 y 0.001 del virus de Zika. Tras el tiempo de infección se retiró el inóculo y se colocaron 100 μl de DMEM suplementado con SFB al 15%.

A los tiempos 0, 12 y 24 horas se retiró el medio, se fijó la monocapa con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con PBS/ Triton X-100 al 0.25%, se bloquearon con PBST/ BSA al 1%. Se incubaron con el anticuerpo anti-E del virus del dengue a la dilución 1:50, según lo indicado por el inserto. Posteriormente se adicionó el anticuerpo IgG de conejo contra ratón marcado con AFL 488 (Abcam, ab150113) a una dilución 1:1000. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen, H1399) a una dilución 1:1000, incubando a temperatura ambiente de 10 a 15 min. Terminado el tiempo se colocó el cubreobjetos sobre la monocapa con 10 μl de PBS en cada pozo y se selló con barniz.

En cada cámara-portaobjeto se montaron un control sin infección y sin bloqueo, y uno con infección y con bloqueo. El procedimiento de bloqueo se realizó con cada uno de los anticuerpos contra las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 de manera individual y en combinaciones AXL/TYRO-3 y TIM-1/TYRO-3 así como el bloqueo simultáneo de las tres proteínas en conjunto.

Se analizaron las monocapas con un microscopio Zeiss Axio Observer A2 con epifluorescencia y sistema Apotome 2. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron en GraphPad Prism 10.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Propagación del virus de Zika

La propagación del virus de Zika se realizó en la línea celular C6/36 ya que provienen directamente del mosquito *Aedes albopictus*, vector principal del dengue (Miller et al., 2018). Tras haber inoculado las botellas de 25 cm² con la cepa ZIKV CIENI-551 se hizo un registro fotográfico del efecto citopático (CPE), el cual se describe como las diversas alteraciones patológicas en las células desencadenadas por virus eucariotas (Agol, 2012); si bien, no todos los virus eucariotas producen efectos citopáticos, los flavivirus, como el virus de Zika, generan cambios estructurales como migración celular, fusión de membranas celulares y la formación de sincicios que a gran escala forma las placas líticas (Fang et al., 2011), como se observa en la **figura 7**. A las 48 h.p.i. se observó la incipiente formación de sincicios celulares, los cuales a las 72 h.p.i. se presentan de manera más abundante y de mayor tamaño.

Se ha reportado que el efecto citopático es evidente desde las 12 h.p.i. lo que destaca la alta eficiencia del virus Zika para infectar y replicarse en células derivadas de su vector primario. Este hallazgo es consistente con la susceptibilidad conocida de las células C6/36 a la infección por Zika y otros flavivirus (Miller et al., 2018). La alta capacidad de replicación observada en estas células apoya su uso como un modelo adecuado para la propagación viral.

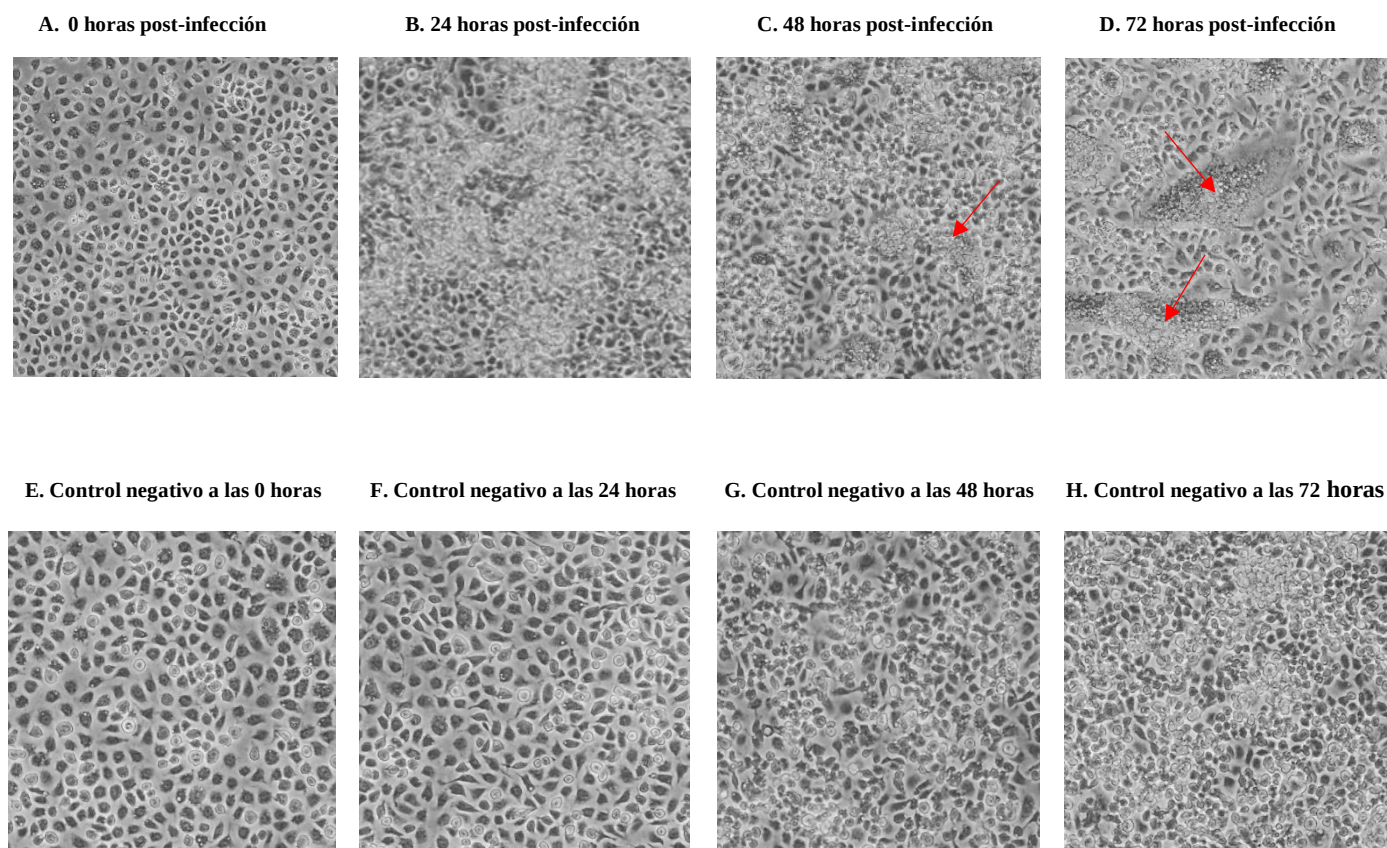


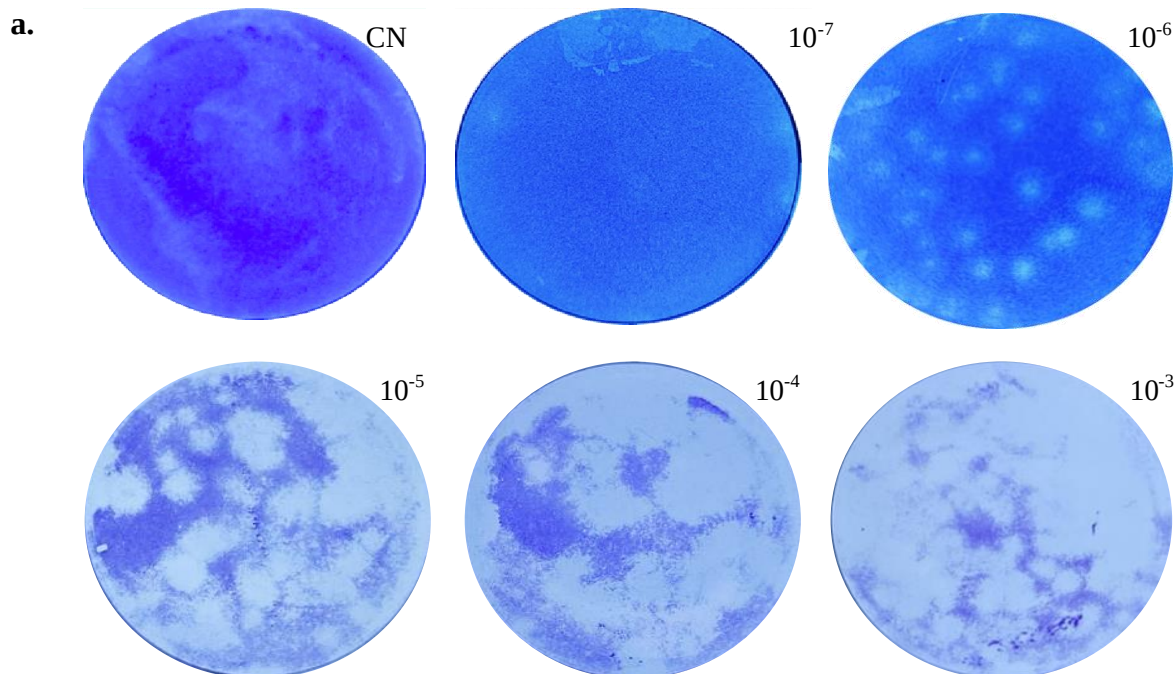
Figura 7. Efecto citopático en la propagación del virus de Zika en la línea celular C6/36 a través del tiempo (0, 24, 48 y 72 hrs). Se marcan con flechas rojas los sincicios.

Después de 72 h.p.i. se recolectó el sobrenadante para realizar la titulación viral. Se realizaron alícuotas del sobrenadante de 200 µl y se almacenaron a -70°C.

9.2 Titulación del virus de Zika

Para la titulación del virus de Zika que fue recolectado del sobrenadante de la propagación realizada en las células C6/36, se utilizó la línea celular BHK-21 y el método de placas líticas (técnica macroscópica del CPE), los cuales han sido descritos como la línea celular y el método por excelencia para la titulación de flavivirus (Arias & Mora-Rodríguez, 2021; Carneiro et al., 2022) aplicando la metodología mencionada en el apartado 7.4 de este documento.

En la **figura 8a** se observa la placa de 6 pozos con los resultados de formación de placas líticas usando células BHK-21 infectadas con diluciones seriadas del virus de Zika. Se muestran diferentes grados de lisis celular en función de la concentración viral. Las placas líticas se observan desde la dilución 10^{-6} y a medida que disminuye la dilución (de 10^{-6} a 10^{-3}), se observa un incremento en la cantidad y tamaño de placas líticas, lo cual indica una mayor replicación viral y efecto citopático en las células. El control negativo (CN) no muestra signos de lisis, lo que confirma que la lisis celular observada en las demás condiciones es consecuencia directa de la infección viral y no de otros factores externos. La **figura 8b** muestra la fórmula y los cálculos realizados para obtener el título viral en UFP/ml.



b)

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{\# \text{placas}}{\text{volúmen del inóculo}} \times \text{Inverso de la dilución}$$

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{30 \text{ placas}}{0.6 \text{ ml}} \times 10^{-6}$$

$$\frac{UFP}{ml} = 5 \times 10^7$$

Figura 8. Titulación del virus de Zika en la línea celular BHK-21. Placa de 6 pozos con monocapas celulares de BHK-21, se muestran de izquierda a derecha de arriba hacia abajo el control negativo, y los pertenecientes a las diluciones decimales -7, -6, -5, -4 y -3, fijados y teñidos con cristal violeta a las 48 horas post infección (A). Se utilizó el pozo a la dilución 10⁻⁶ para realizar el conteo de las placas líticas, se contaron 30 placas líticas y se muestra el procedimiento para la obtención del título viral en UFP/ml (B).

El cálculo de unidades formadoras de placas (UFP) proporciona una medida cuantitativa de la infectividad viral, en este estudio estamos reportando un título de 5x10⁷ UFP/ml. Este resultado es congruente con títulos virales reportados en estudios previos con la misma línea celular. Balasubramanian et al. (2017) reportaron un título viral de 4.8x10⁷ UFP/ml. Mientras que Almanza- Holguín y Duque-Varela (2020) obtuvieron un título de 5X10⁵ UFP/ml, lo cual respalda la validez y precisión de la metodología empleada en este experimento.

9.3 Cinética de replicación viral

El propósito de este experimento fue determinar la cinética de replicación del virus de Zika (ZIKV) en la línea celular C33-A, que corresponde a células de carcinoma cervicouterino humano. Este análisis es fundamental para establecer los periodos de máxima replicación y evaluar la permisividad de esta línea celular frente al virus. La elección de la línea C33-A se debe a su relevancia como modelo de estudio para infecciones en el tracto genital femenino, un tejido de interés en la transmisión del ZIKV y la falta de información en la bibliografía.

Se realizaron infecciones a diferentes multiplicidades de infección (MOI 0.1, 0.01 y 0.001) en células C33-A cultivadas en monocapa. Las muestras fueron recolectadas a intervalos de tiempo específicos (0, 12, 24, 48 y 72 horas post-infección) para evaluar el título viral mediante un ensayo de unidades formadoras de placas (UFP) en células BHK-21. Este procedimiento se realizó en tres experimentos independientes para garantizar la reproducibilidad de los resultados (**figura 9**).

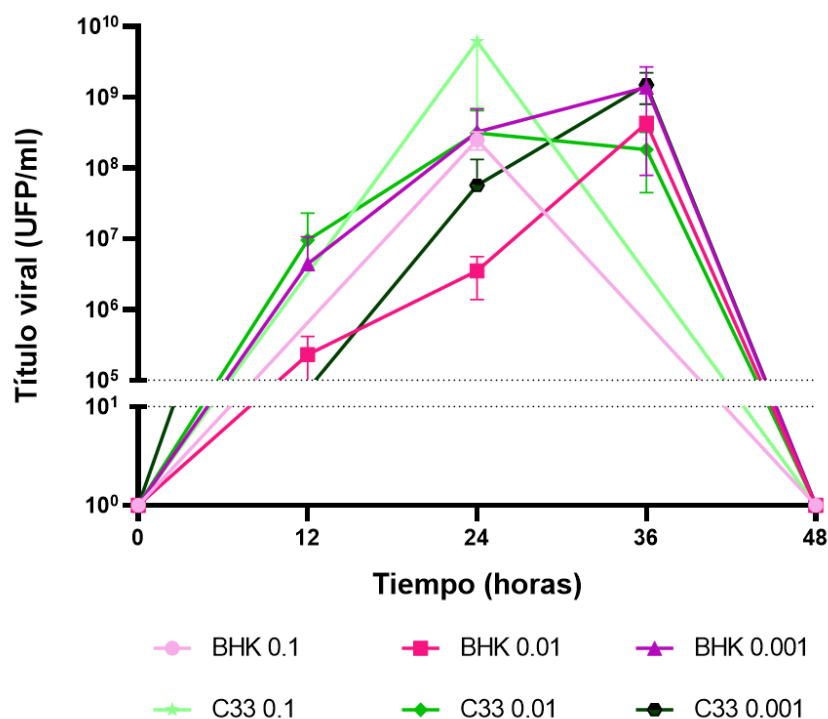


Figura 9. Cinética de replicación viral. Títulos virales obtenidos de cada una de las muestras recogidas a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas infectadas por el virus de Zika con MOI de 0.1, 0.01 y 0.001 tanto en células C33-A (líneas verdes) como en células BHK-21 (líneas rosas). El rango entre 10^1 y 10^5 (títulos virales) se omitió para fines de mejor visualización.

Los datos obtenidos muestran que la replicación viral comenzó a detectarse a las 12 horas post-infección, alcanzando un pico máximo a las 48 horas. En ambos MOIs, la producción de partículas virales fue significativamente mayor en las condiciones de MOI 0.01 en comparación con MOI 0.001. Esto indica una relación dependiente de la dosis viral en la cinética de replicación. Estos resultados confirman que las células C33-A son permisivas a la replicación del ZIKV y que la producción viral sigue un patrón cinético dependiente del tiempo y la multiplicidad de infección. El pico de replicación observado a las 48 horas es consistente con estudios previos en otras líneas celulares, lo que refuerza la utilidad de las células C33-A como modelo para estudiar la dinámica de replicación del ZIKV. Aunque la titulación viral en células BHK-21 ha sido ya reportada como se menciona en el apartado 8.2,

no existen antecedentes bibliográficos previos para la línea celular C33-A, lo que otorga mayor relevancia a los datos de este estudio.

9.4 Susceptibilidad y permisividad de la línea celular C33-A

El objetivo de este experimento fue evaluar la susceptibilidad y permisividad de las células C33-A, una línea celular de carcinoma cervicouterino humano, a la infección por el virus de Zika (ZIKV). Este análisis es crucial para determinar si estas células son un modelo adecuado para estudiar la replicación viral.

La línea celular C33-A, derivada de un carcinoma cervicouterino humano y negativa para el virus del papiloma humano (VPH), es ampliamente utilizada como modelo en estudios oncológicos y virológicos. A diferencia de otras líneas celulares, como HeLa, que son positivas para VPH, las células C33-A presentan características genéticas y funcionales únicas que las hacen relevantes para analizar mecanismos moleculares independientes de la infección por VPH. Estudios previos han demostrado diferencias significativas en la expresión de ligandos y metaloproteinasas entre las líneas C33-A y HeLa, lo que resalta su utilidad e investigaciones específicas (García et al., 2019).

Se realizaron infecciones con ZIKV a distintas diluciones (10^{-3} a 10^{-9}) en tres experimentos independientes, utilizando monocapas celulares en cámaras-portaobjetos de 8 pocillos. La presencia del virus fue determinada mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal que reconoce la glicoproteína E del virus del dengue, conocido por cruzar antigénicamente con el ZIKV. La intensidad de la fluorescencia fue analizada en el programa

Zeiss Zen 3.8, evaluando la fluorescencia de cada célula y calculando un promedio como indicador de la infección.

Las células C33-A demostraron ser susceptibles al ZIKV, mostrando fluorescencia específica de la proteína E incluso en diluciones altas (10^{-9}). En la **Figura 10** se presentan las imágenes más representativas. La señal de fluorescencia se correlacionó con la concentración inicial del inóculo, siendo más intensa en las diluciones bajas. Estos resultados indican que las células C33-A permiten una eficiente entrada y replicación del ZIKV, evidenciando su permisividad.

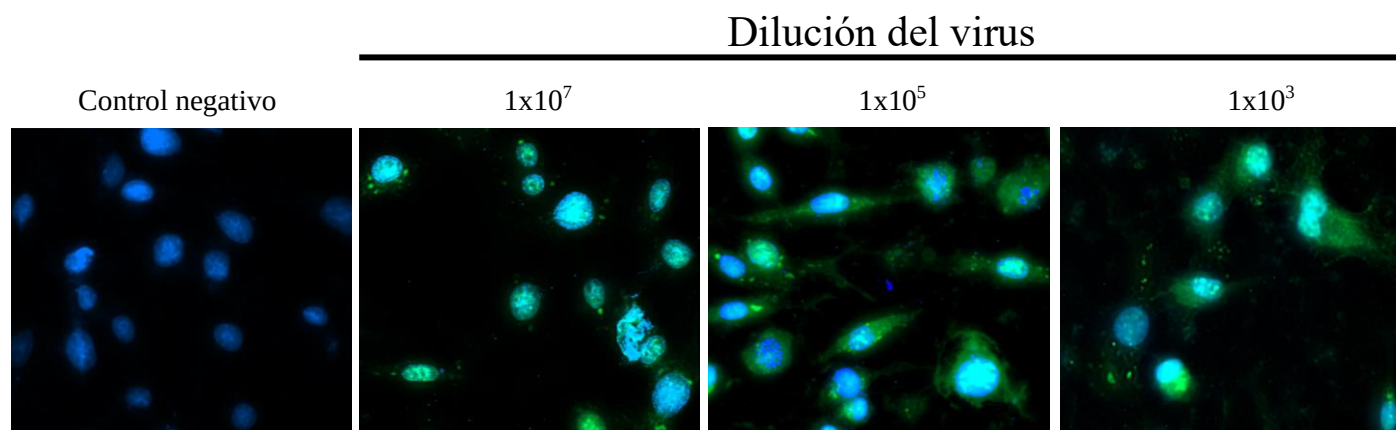


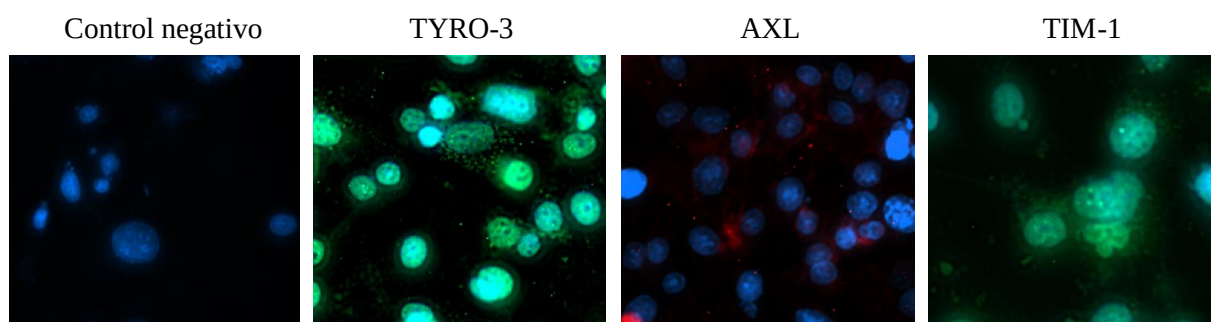
Figura 10. Presencia de la proteína E a diferentes diluciones virales. Se muestran cuatro imágenes de células C33-A en las que la proteína E del virus de Zika se marcó con AFL 488 (Abcam, ab150113) (verde), y los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio invertido Zeiss, modelo Axio Observer A2, con sistema de seccionamiento óptico utilizando iluminación estructurada marca Zeiss modelo Apotome 2.

Estos hallazgos sugieren que las células C33-A son un modelo adecuado para estudiar la interacción entre el ZIKV y células epiteliales humanas.

9.5 Identificación de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A

Tras confirmar la susceptibilidad y permisividad de la línea celular C33-A a la infección por el virus de Zika, se procedió a investigar la presencia de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la superficie de estas células. Dichas proteínas, han sido ampliamente estudiadas en otras líneas celulares, como HaCaT (queratinocitos humanos) y Huh7.5 (hepatocitos humanos) (Kirui et al., 2021), debido a su relevancia en el proceso de entrada del virus de Zika en diversos tejidos, desempeñando un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria y en la mediación de la entrada viral. En este caso, el análisis se realizó de forma cualitativa y por triplicado, observando la expresión y distribución de estas proteínas mediante técnicas de inmunofluorescencia.

A)



B)

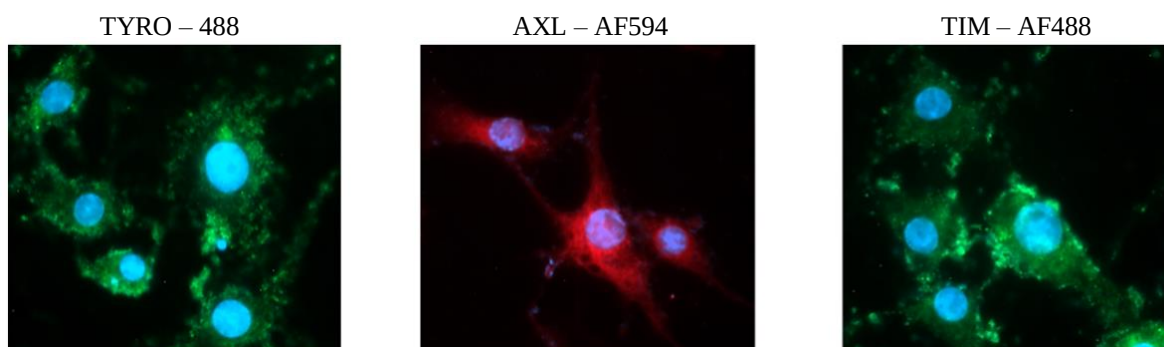


Figura 11. Presencia de las proteínas TYRO-3, AXL y TIM-1 en la superficie de células C33-A con y sin infección. A) Células C33-A. De izquierda a derecha, control negativo (sin anticuerpo), TYRO-3 (AF-488), AXL (AF-594) y TIM-1(AF-488), los núcleos se tiñeron con Hoechst Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido Zeiss, modelo Axio Observer A2 con un objetivo 40x. B) Imágenes en detalle de la presencia de las proteínas TYRO-3, AXL y TIM-1 sobre la superficie de la célula C33-A, tomadas a 63x con aceite de inmersión. Todos los núcleos se tiñeron

con Hoechst (azul) los anticuerpos TIM-1 y TYRO-3 se observan en verde mientras que el anticuerpo AXL se muestra en rojo.

Las imágenes obtenidas demuestran la presencia de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO3 en la superficie de las células C33-A. En el panel A las imágenes se tomaron a 40X. El control negativo (células C33-A sin tratamiento con anticuerpos específicos, pero procesadas bajo las mismas condiciones experimentales) muestra una ausencia de señal fluorescente, lo que indica la especificidad de la tinción de los receptores. En contraste, las imágenes correspondientes a cada receptor muestran una señal clara de fluorescencia: verde para TYRO3 (AF488) y TIM-1 (AF488), y roja para AXL (AF594).

La imagen B tomadas a 63X, que proporciona un mayor detalle, resalta aún más la localización de estos receptores en la superficie celular, evidenciando su expresión en la línea C33-A. Estos resultados son significativos ya que confirman la expresión de AXL, TIM-1 y TYRO3 en estas células.

9.6 Expresión de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO3 en respuesta a la infección por el virus de Zika

Tras haber identificado satisfactoriamente la presencia de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la membrana de las células C33-A, se llevó a cabo la cuantificación en unidades de fluorescencia relativa por micrómetro cuadrado tanto en condiciones sin infección como con infección por virus de Zika con MOI de 0.01 y 0.001.

Se evaluó la expresión del receptor AXL en células C33-A infectadas con el virus de Zika a MOI 0.01 y MOI 0.001, comparando las condiciones sin infección (S/I) y con infección (C/I) en tiempos de 0, 12 y 24 horas. La MOI de 0.1 causa una muerte celular demasiado rápida y no es viable el análisis de los receptores, motivo por el cual se omitió del análisis. La

intensidad de fluorescencia relativa (UFR/ μm^2) es cuantificada utilizando un microscopio invertido Zeiss, modelo Axio Observer A2, equipado con iluminación estructurada (Zeiss Apotome 2). Los datos obtenidos son analizados estadísticamente mediante pruebas como ANOVA y t de Student en el programa GraphPad Prism 8 (**figura 12**). Debido al gran volumen de imágenes se presentan las imágenes representativas de los experimentos en la **figura 13**.

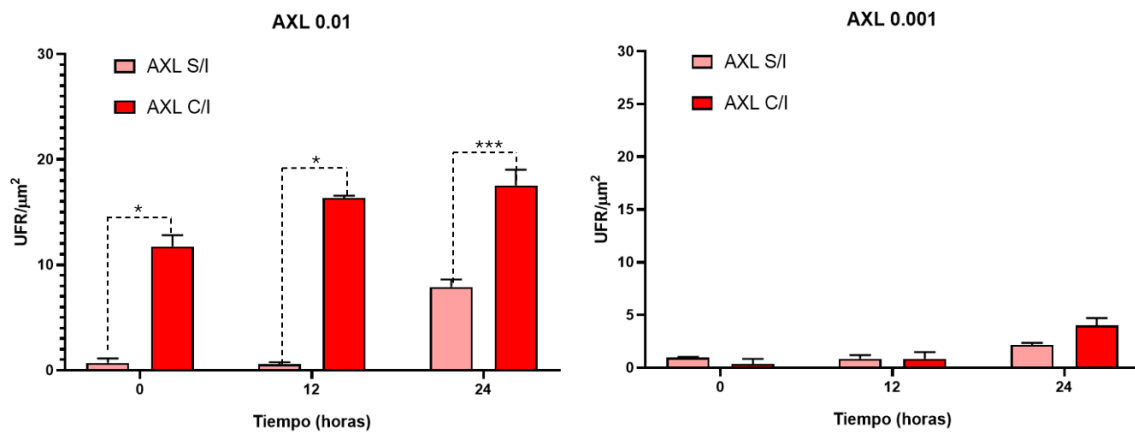
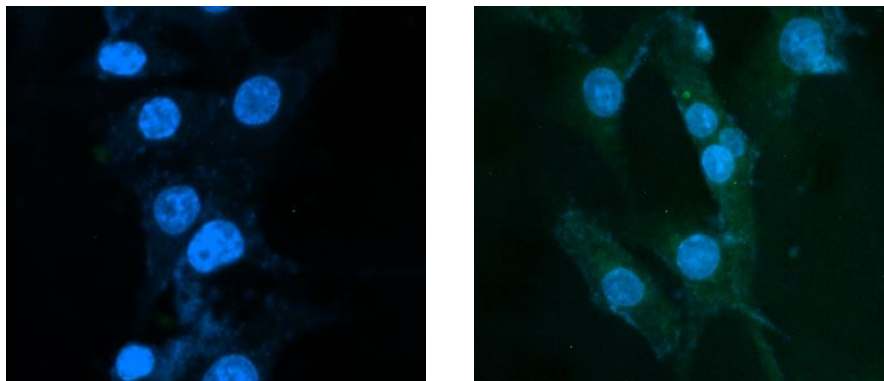
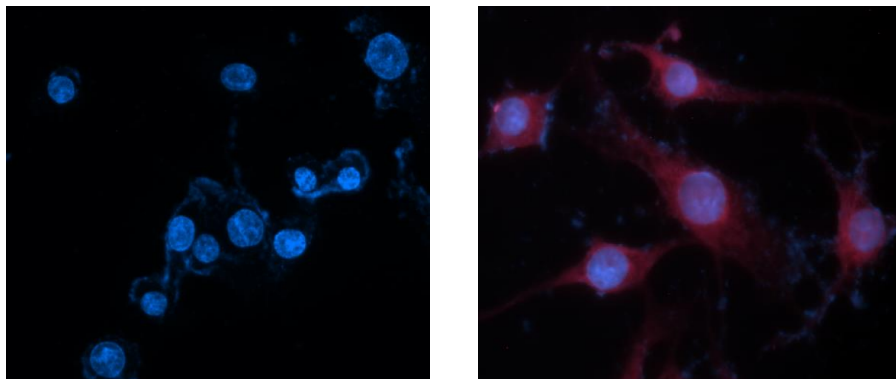


Figura 12. Expresión del receptor AXL en células C33-A en respuesta a la infección por el virus de Zika. La gráfica muestra la intensidad de fluorescencia relativa (UFR/ μm^2) del receptor AXL en células sin infección (AXL S/I) y con infección (AXL C/I) a diferentes tiempos (0, 12 y 24 horas) y concentraciones virales (0.01 y 0.001).

A)



B)



C)

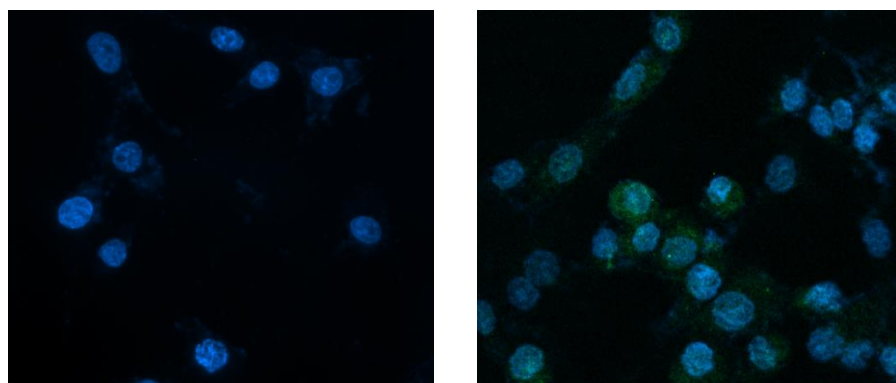


Figura 13. Comparación entre el control negativo y las células C33-A infectadas con ZIKV a las 12 horas post-infección. En las imágenes se observa la detección por inmunofluorescencia de los receptores: **A)** TIM-1, **B)** AXL y **C)** TYRO-3. De lado izquierdo observamos los controles sin anticuerpo y a la derecha observamos las muestras con los anticuerpos correspondientes. Todas las imágenes corresponden a una MOI de 0.01. Las muestras fueron analizadas utilizando el microscopio invertido Zeiss Axio Observer A2 con iluminación estructurada (Apotome 2). La intensidad de fluorescencia específica se cuantificó en unidades de fluorescencia relativa (UFR), evidenciando diferencias entre las células infectadas y el control negativo.

La expresión del receptor AXL presentó diferencias significativas entre células infectadas (C/I) y no infectadas (S/I) a una MOI de 0.01 en tiempos de 0 horas ($p = 0.0426$), 12 horas ($p = 0.0401$) y 24 horas ($p = 0.0028$). Esto sugiere que AXL podría ser un mediador relevante en la interacción inicial entre el virus de Zika y las células C33-A, particularmente en etapas tempranas de la infección. La disminución del valor de p conforme avanzan las horas post-

infección (hpi) podría indicar una dinámica más activa de este receptor en las fases iniciales de la replicación viral, posiblemente vinculada a una regulación inducida por el virus para facilitar su entrada. Además, la diferencia significativa en la expresión de AXL en células no infectadas al comparar las MOI de 0.01 y 0.001 a las 12 horas ($p = 0.0345$) plantea la posibilidad de que la cantidad de estímulo viral, incluso en ausencia de infección activa, pueda alterar la modulación basal de este receptor. Esto podría interpretarse como una respuesta celular inespecífica al estímulo externo,

Se siguió la misma metodología para evaluar la expresión de los receptores TIM-1 y TYRO-3 obteniendo las siguientes gráficas.

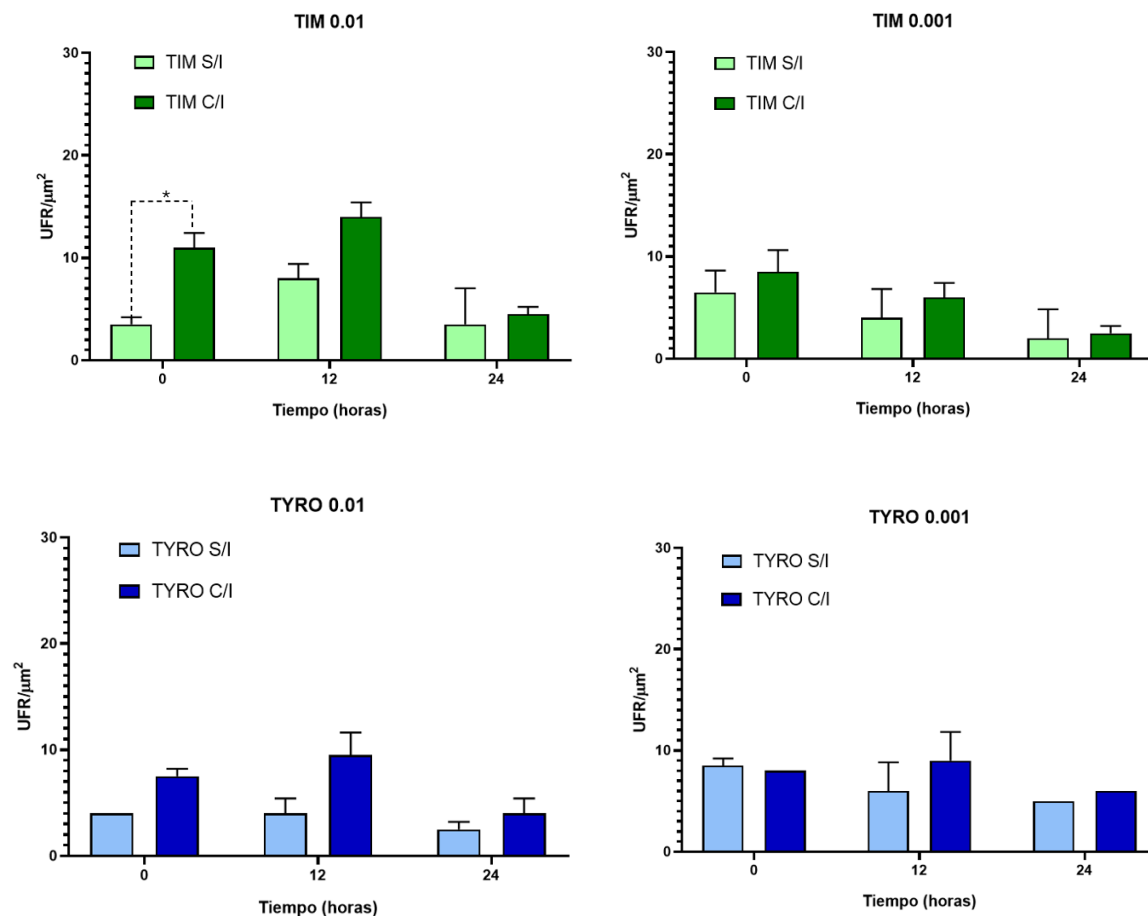


Figura 14. Expresión de los receptores TIM-1 y TYRO-3 en células C33-A en respuesta a la infección por el virus de Zika. Intensidad de fluorescencia relativa (UFR/ μm^2) de los receptores TIM-1 y TYRO-3 en células sin infección (S/I) y con infección (C/I) a diferentes tiempos (0, 12 y 24 horas) y concentraciones virales (0.01 y 0.001).

La expresión de estos receptores también se analizó con t de Student y los resultados del valor de p se encuentran plasmadas en las **TABLAS 4, 5, 6, 7, 8 y 9** encontradas en los anexos de esta tesis.

Los resultados muestran que TIM-1 tiene una expresión significativamente mayor en células infectadas (C/I) en comparación con células no infectadas (S/I) a tiempo 0 con una MOI de 0.01 ($p = 0.0291$). Este hallazgo refuerza la hipótesis de que TIM-1 actúa como un facilitador en las primeras interacciones del virus con las células huésped, favoreciendo la entrada viral mediante su capacidad de unión a fosfatidilserina. Por otro lado, la diferencia significativa en la expresión de TIM-1 en células infectadas a una MOI de 0.001 entre 0 y 12 horas ($p = 0.0185$) sugiere que este receptor podría ser inducido de manera transitoria en las etapas iniciales de la infección. Este comportamiento transitorio podría estar relacionado con un mecanismo de retroalimentación celular, posiblemente mediado por señales intracelulares asociadas a la detección de la infección.

En cuanto a TYRO3, se observaron diferencias significativas en células infectadas frente a no infectadas (C/I vs. S/I) a las 24 horas a una MOI de 0.01 ($p = 0.001$). Este resultado destaca un papel potencial de este receptor en etapas más avanzadas de la infección, sugiriendo que, a diferencia de AXL y TIM-1, TYRO3 podría estar involucrado en procesos posteriores a la entrada viral, como la replicación o la modulación de la respuesta celular al virus. La diferencia marginalmente significativa en células no infectadas al comparar las MOI de 0.01 y 0.001 a tiempo 0 ($p = 0.0498$) podría implicar que este receptor también responde a

estímulos virales inespecíficos, aunque con menor sensibilidad que AXL o TIM-1. Esta respuesta sugiere que, aunque TYRO3 es menos prominente en las fases iniciales de la interacción viral, su expresión aún puede ser modulada por factores externos, como la presencia de partículas virales.

Los resultados confirman que los receptores AXL, TIM-1 y TYRO3 desempeñan roles diferenciales en la infección por el virus de Zika, dependiendo del tiempo post-infección y de la multiplicidad de infección utilizada. AXL y TIM-1 parecen ser más relevantes en las fases tempranas de la infección, con una expresión modulada en respuesta a la carga viral. Este comportamiento coincide con estudios previos que señalan a AXL como un receptor crítico para la entrada del virus y a TIM-1 como un cofactor que facilita la internalización del ZIKV. TYRO3, por otro lado, muestra su mayor relevancia en etapas más tardías, lo que podría indicar un papel en la modulación de la respuesta celular o en la replicación viral. Esto sugiere que los receptores TAM no solo actúan como puntos de entrada, sino también como mediadores potenciales de la infección y propagación viral dentro de la célula huésped.

9.7 Bloqueo de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A con anticuerpos específicos

El bloqueo de las proteínas AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la línea celular C33-A se realizó con el objetivo de evaluar la funcionalidad de estos receptores en la entrada del virus de Zika (ZIKV). Utilizando anticuerpos monoclonales específicos, se bloquearon los receptores de manera individual y en combinación triple, analizando el porcentaje de infección viral en dos experimentos independientes a dos multiplicidades de infección (MOI 0.01 y 0.001)

mediante inmunofluorescencia cuantificada con el software Zeiss Zen 3.8 y analizando la información en el programa GraphPad Prism 8.

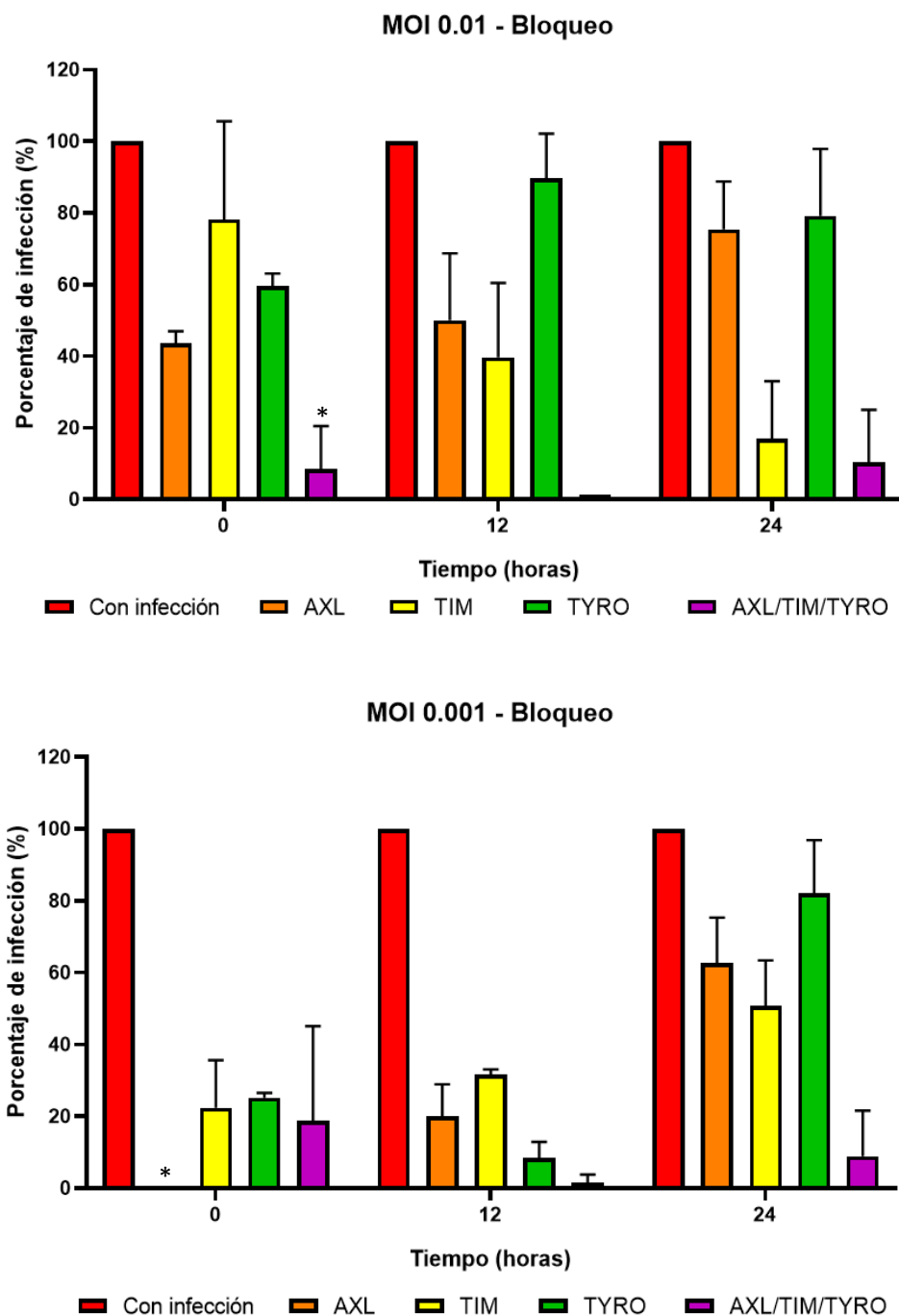


Figura 15. Bloqueo de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO3 en la infección por el virus de Zika en células C33-A. Porcentaje de infección en células C33-A tras la infección por el virus de Zika en presencia de anticuerpos dirigidos contra los receptores AXL, TIM-1 y TYRO3. Se muestran las

condiciones con tratamiento de anticuerpos individuales (AXL, TIM, TYRO), combinación triple (AXL/TIM/TYRO) y la condición control sin tratamiento con anticuerpos, utilizada como referencia para el 100% de fluorescencia (indicado con la barra roja). Los datos representan la infección medida en diferentes tiempos post-infección (0, 12 y 24 horas) y bajo dos multiplicidades de infección (MOI 0.01 y 0.001). Los experimentos se realizaron en dos réplicas independientes. La reducción del porcentaje de infección en las condiciones con anticuerpos refleja el efecto observado del bloqueo mediado por los receptores estudiados.

Los resultados de la **figura 15** muestran que el bloqueo individual de AXL, TIM-1 o TYRO-3 reduce moderadamente la infección viral, particularmente a MOI 0.01 y en los tiempos de 12 y 24 horas. Sin embargo, el triple bloqueo produjo una disminución drástica y estadísticamente significativa ($p = 0.0406$), lo que sugiere un efecto sinérgico entre los tres receptores. A MOI 0.001, aunque el porcentaje de infección fue menor debido a la baja cantidad de partículas virales, el bloqueo de TIM resultó ser el único con un efecto significativo ($p = 0.0427$), destacando su importancia en dosis virales bajas. El cuadro rojo en las gráficas representa el 100% de fluorescencia observada en la condición sin tratamiento con anticuerpos, utilizada como referencia para comparar los efectos del bloqueo.

El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre las condiciones en ambas MOI ($p = 0.0035$ para MOI 0.01 y $p = 0.0040$ para MOI 0.001). Las pruebas *post hoc*, como la *t* de Student, confirmaron que, a MOI 0.01, el triple bloqueo fue la única condición con un cambio significativo respecto al control ($p = 0.0406$), mientras que, a MOI 0.001, el bloqueo de TIM fue significativo ($p = 0.0427$). Esto sugiere que TIM desempeña un papel relevante en dosis bajas de infección, mientras que el efecto del triple bloqueo es más pronunciado a dosis ligeramente mayores (MOI 0.01), en concordancia con los datos de expresión de receptores presentados previamente.

Estudios previos han demostrado la importancia de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 en la entrada del ZIKV en células BHK-21 mediante ensayos de inhibición (Loza-Lay, 2019).

También se ha reportado que AXL y TIM-1, de forma independiente, pueden reducir la infección por flavivirus en líneas como las células de Sertoli (Strange et al., 2019; Zhang et al., 2022). Sin embargo, no hay estudios adicionales que exploren el efecto de la inhibición conjunta de estos receptores, lo que resalta la relevancia de los hallazgos obtenidos en este trabajo.

Aunque el triple bloqueo de los receptores AXL, TIM-1 y TYRO-3 fue altamente eficaz en reducir la infección por el virus de Zika en las células C33-A, no eliminó completamente la entrada viral. Este resultado sugiere la posible participación de otros receptores, como DC-SIGN, CLEC5A, NCAM1, integrina $\alpha V\beta 5$ y EGFR, previamente identificados en la literatura como mediadores de la entrada de flavivirus (S. T. Chen et al., 2008; Sabbah et al., 2020). Esto destaca la complejidad de las interacciones entre el ZIKV y sus receptores y sugiere que una estrategia terapéutica eficaz podría requerir la inhibición de múltiples rutas receptoras para lograr una reducción completa de la infección.

Diversos estudios, como los de Prisant et al. (2016) y Morelli et al. (2020), subrayan la importancia de profundizar en los mecanismos celulares y moleculares de la transmisión del ZIKV en el tracto genital femenino. Los resultados de este trabajo sientan las bases para futuros estudios en esta área.

10. CONCLUSIÓN

Este estudio presenta los primeros hallazgos sobre la interacción entre el virus Zika (ZIKV) y los receptores AXL, TIM-1 y TYRO3 en la superficie de las células de cérvix uterino (C33-A). Los experimentos confirmaron que estas células son altamente susceptibles al virus, incluso más que la línea celular BHK-21, y que los receptores AXL, TIM-1 y TYRO3

desempeñan un papel fundamental en la infección. Se observó que estos receptores tienen roles diferenciados según el tiempo post-infección y la multiplicidad de infección (MOI): AXL y TIM-1 participan predominantemente en las fases iniciales del ciclo viral, mientras que TYRO3 es más relevante en etapas posteriores. Este comportamiento subraya la complejidad de las interacciones entre ZIKV y sus receptores celulares.

El bloqueo individual de estos receptores redujo moderadamente la infección viral, pero el bloqueo simultáneo de los tres resultó en una disminución significativamente mayor, particularmente a una MOI de 0.01. Sin embargo, la infección no fue completamente eliminada, lo que sugiere la participación de otros receptores, como DC-SIGN, CLEC5A, NCAM1, integrina $\alpha V\beta 5$ y EGFR, previamente descritos en la literatura. Esto resalta la necesidad de realizar estudios adicionales para identificar vías alternas de entrada viral.

Estos hallazgos destacan la importancia de AXL, TIM-1 y TYRO3 como receptores clave en la infección por ZIKV, pero también sugieren la existencia de vías alternativas que podrían facilitar la entrada viral en ausencia de estos receptores. Este aspecto es particularmente relevante para la investigación de la transmisión sexual del Zika en el tracto genital femenino, dado su impacto potencial en la salud reproductiva y la transmisión vertical en mujeres embarazadas. Comprender estos mecanismos es esencial para desarrollar intervenciones preventivas más efectivas que reduzcan la diseminación del virus y protejan la salud femenina en contextos de transmisión sexual.

El estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la entrada del virus Zika abre nuevas posibilidades para el diseño de inhibidores específicos contra los receptores identificados o para el desarrollo de terapias combinadas que bloqueen múltiples rutas de

entrada viral. Además, investigaciones futuras podrían centrarse en identificar otros receptores o vías relevantes para la infección, especialmente en el contexto de la transmisión sexual y vertical. Finalmente, este trabajo sienta las bases para el desarrollo de modelos experimentales más representativos del tracto genital femenino, permitiendo la evaluación de estrategias preventivas y terapéuticas con un enfoque integral en la salud reproductiva.

11. REFERENCIAS

- Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A. D., Pavão, M. S., Tzanakakis, G. N., & Karamanos, N. K. (2012). Glycosaminoglycans: Key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS Journal*, 279(7), 1177–1197. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2012.08529.X>
- Agol, V. I. (2012). Cytopathic effects: virus-modulated manifestations of innate immunity? *Trends in Microbiology*, 20(12), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.003>
- Agrelli, A., de Moura, R. R., Crovella, S., & Brandão, L. A. C. (2019). ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution*, 69, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>
- Almanza-Holguín, L.-N., & Duque-Varela, J.-P. (2020). *ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TÍTULOS VIRALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO: VIRUS DENGUE Y ZIKA*. Universidad El Bosque.
- Arias, J., & Mora-Rodríguez, R. (2021). Generation and Implementation of Reporter BHK-21 Cells for Live Imaging of Flavivirus Infection. *BIO-PROTOCOL*, 11(5). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3942>
- Balasubramanian, A., Teramoto, T., Kulkarni, A. A., Bhattacharjee, A. K., & Padmanabhan, R. (2017). Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Research*, 137, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.015>
- Barjas-Castro, M. L., Angerami, R. N., Cunha, M. S., Suzuki, A., Nogueira, J. S., Rocco, I. M., Maeda, A. Y., Vasami, F. G. S., Katz, G., Boin, I. F. S. F., Stucchi, R. S. B., Resende, M. R., Esposito, D. L. A., de Souza, R. P., da Fonseca, B. A., & Addas-Carvalho, M. (2016). Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*, 56(7), 1684–1688. <https://doi.org/10.1111/trf.13681>
- Barzon, L., Pacenti, M., Berto, A., Sinigaglia, A., Franchin, E., Lavezzo, E., Brugnaro, P., & Palù, G. (2016). 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*, 21(10). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30159>
- Bethune, G., Bethune, D., Ridgway, N., & Xu, Z. (2010). Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *Journal of Thoracic Disease*, 2(1), 48–51.
- Bhardwaj, U., Pandey, N., Rastogi, M., & Singh, S. K. (2021). Gist of Zika Virus pathogenesis. *Virology*, 560, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.04.008>
- Bohan, D., & Maury, W. (2021). Enveloped RNA virus utilization of phosphatidylserine receptors: Advantages of exploiting a conserved, widely available mechanism of entry. *PLoS Pathogens*, 17(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009899>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., ... Bolognesi, M. (2010).

- Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125–148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>
- Bournazos, S., Gupta, A., & Ravetch, J. V. (2020). The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nature Reviews Immunology*, 20, 633–643. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., Valderramos, S. G., Halai, U.-A., Salles, T. S., Zin, A. A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Raja Gabaglia, C., Carvalho de Sequeira, P., Pilotto, J. H., Medialdea-Carrera, R., Cotrim da Cunha, D., ... Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2321–2334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>
- Caine, E. A., Scheaffer, S. M., Arora, N., Zaitsev, K., Artyomov, M. N., Coyne, C. B., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2019). Interferon lambda protects the female reproductive tract against Zika virus infection. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07993-2>
- Cao, J., Qing, J., Zhu, L., & Chen, Z. (2024). Role of TIM-1 in the development and treatment of tumours. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1307806>
- Carneiro, P. H., Mendes-Monteiro, L., & Mohana-Borges, R. (2022). *Virus Propagation and Plaque Assay for Dengue Virus* (pp. 3–9). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1879-0_1
- Carpenter, A., & Clem, R. J. (2023). Factors Affecting Arbovirus Midgut Escape in Mosquitoes. *Pathogens*, 12(2), 220. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020220>
- Carrera, B., Vigil, P., Cortés Cortés, M., Haüyón Riquelme, R., & Aravena, C. (2014). *El Moco Cervical en la Fisiología Reproductiva*.
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M. D., Abadie, V., Garel, C., Fontanet, A., & Mallet, H.-P. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet*, 387(10033), 2125–2132. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6)
- Chen, H.-L., & Tang, R.-B. (2016). Why Zika virus infection has become a public health concern? *Journal of the Chinese Medical Association*, 79(4), 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2016.03.001>
- Chen, H.-R., Lai, Y.-C., & Yeh, T.-M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>
- Chen, S. T., Lin, Y. L., Huang, M. T., Wu, M. F., Cheng, S. C., Lei, H. Y., Lee, C. K., Chiou, T. W., Wong, C. H., & Hsieh, S. L. (2008). CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 2008 453:7195, 453(7195), 672–676. <https://doi.org/10.1038/nature07013>
- Chen, S.-T., Liu, R.-S., Wu, M.-F., Lin, Y.-L., Chen, S.-Y., Tan, D. T.-W., Chou, T.-Y., Tsai, I.-S., Li, L., & Hsieh, S.-L. (2012). CLEC5A Regulates Japanese Encephalitis Virus-Induced

- Neuroinflammation and Lethality. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002655.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002655>
- Conceição-Santos, D. B., Costa-Cardoso, L. C., Barbosa-Torales, A. P., Oliveira-Lima, S., & Cunha-Oliveira, C. C. (2021). Aspectos sociales, sobrecarga y calidad de vida de las madres de niños con microcefalia. *Enfermería Universitaria*, 18(2), 161–176.
<https://doi.org/10.22201/eneo.23958421e.2021.2.947>
- Cui, Y., & Franz, A. W. E. (2020). Heterogeneity of midgut cells and their differential responses to blood meal ingestion by the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 127. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2020.103496>
- Da Cruz, T. E., Souza, R. P., Pelloso, S. M., Morelli, F., Suehiro, T. T., Damke, E., Bonfim-Mendonça, P. de S., Da Silva, V. R. S., & Consolaro, M. E. L. (2019). Case report: Prolonged detection of zika virus RNA in vaginal and endocervical samples from a Brazilian woman, 2018. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(1), 183–186.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0623>
- de Souza, A. A. A., Torres, L. R., Capobianco, L. R. P. L., de Paula, V. S., Cascabulho, C. M., Salomão, K., Bonecini-Almeida, M. da G., Ferreira, M. de L. G., Boechat, N., Pinheiro, L. C. da S., & de Souza, E. M. (2020). Chloroquine and Sulfadoxine Derivatives Inhibit ZIKV Replication in Cervical Cells. *Viruses*, 13(1), 36. <https://doi.org/10.3390/v13010036>
- Diagne, C. T., Diallo, D., Faye, O., Ba, Y., Faye, O., Gaye, A., Dia, I., Faye, O., Weaver, S. C., Sall, A. A., & Diallo, M. (2015). Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 492.
<https://doi.org/10.1186/s12879-015-1231-2>
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Fang, Y., Ye, P., Wang, X., Xu, X., & Reisen, W. (2011). Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *Journal of Virological Methods*, 173(2), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.013>
- Filipe, A. R., Martins, C. M. V., & Rocha, H. (1973). Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 43(4), 315–319.
<https://doi.org/10.1007/BF01556147>
- Flem-Karlsen, K., McFadden, E., Omar, N., Haugen, M. H., Øy, G. F., Ryder, T., Gullestad, H. P., Hermann, R., Mælandsmo, G. M., & Flørenes, V. A. (2020). Targeting AXL and the DNA Damage Response Pathway as a Novel Therapeutic Strategy in Melanoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(3), 895–905. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0290>
- Flint, J., Racaniello, V., Rall, G., Hatzioannou, T., & Skalka, A. (2020). *Principles of Virology* (5th ed.). ASM Press.
- Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A. D., Lanciotti, R. S., & Tesh, R. B. (2011). Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika

- Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 880–882.
<https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>
- Franz, A. W. E., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., & Clem, R. J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, 7, 3741–3767. <https://doi.org/10.3390/v7072795>
- Freitas, D., Santos, R., Carvalho, L., Neves, L., Zin, A., & Wakimoto, M. (2020). Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLOS ONE*, 15(12), 1–27.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>
- García, D. A., Pérez, P., García, L., Cid-Arregui, A., & Aristizabal, F. (2019). Expresión génica de ligandos mica, micb y ulbp (1-6) del receptor NKG2D de células natural killer y metaloproteinasas adam10, adam17 y mmp14 en líneas celulares de cáncer de cervical. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 29–38.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.79730>
- Geijtenbeek, T. B. H., Torensma, R., Van Vliet, S. J., Van Duijnhoven, G. C. F., Adema, G. J., Van Kooyk, Y., & Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell*, 100, 575–585.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, 540(7633), 438–442.
<https://doi.org/10.1038/nature20556>
- Gregory, C. J., Oduyebo, T., Brault, A. C., Brooks, J. T., Chung, K.-W., Hills, S., Kuehnert, M. J., Mead, P., Meaney-Delman, D., Rabe, I., Staples, E., & Petersen, L. R. (2017). Modes of Transmission of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_10), S875–S883.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix396>
- Hastings, A. K., Yockey, L. J., Jagger, B. W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H. F., Parnell, L. A., Cao, B., Mysorekar, I. U., Rothlin, C. V., Fikrig, E., Diamond, M. S., & Iwasaki, A. (2017). TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Reports*, 19(3), 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.058>
- Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1347–1350.
<https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>
- Hsu, P.-L., Jou, J., & Tsai, S.-J. (2019). Minireview TYRO3: A potential therapeutic target in cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 244, 83–99.
<https://doi.org/10.1177/1535370219828195>
- Huber, R. G., Lim, X. N., Ng, W. C., Sim, A. Y. L., Poh, H. X., Shen, Y., Lim, S. Y., Sundstrom, K. B., Sun, X., Aw, J. G., Too, H. K., Boey, P. H., Wilm, A., Chawla, T., Choy, M. M., Jiang, L., de Sessions, P. F., Loh, X. J., Alonso, S., ... Wan, Y. (2019). Structure mapping of dengue and Zika viruses reveals functional long-range interactions. *Nature Communications*, 10(1), 1408. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09391-8>
- Khandia, R., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Malik, Y. S., Singh, R. K., & Chaicumpa, W. (2018). Modulation of Dengue/Zika Virus Pathogenicity by Antibody-

- Dependent Enhancement and Strategies to Protect Against Enhancement in Zika Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00597>
- Kim, S. Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., Zhang, F., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2017). Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry*, 56(8), 1151. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.6B01056>
- Kirui, J., Abidine, Y., Lenman, A., Islam, K., Gwon, Y.-D., Lasswitz, L., Evander, M., Bally, M., & Gerold, G. (2021). The Phosphatidylserine Receptor TIM-1 Enhances Authentic Chikungunya Virus Cell Entry. *Cells*, 10(7), 1828. <https://doi.org/10.3390/cells10071828>
- Klaitong, P., & Smith, D. R. (2021). Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection. *Viruses*, 13(10), 2077. <https://doi.org/10.3390/v13102077>
- Knipe, D., & Whelan, S. (2020). *Fields Virology* (7th ed., Vol. 1). Wolters Kluwer.
- Kondratowicz, A. S., Lennemann, N. J., Sinn, P. L., Davey, R. A., Hunt, C. L., Moller-Tank, S., Meyerholz, D. K., Rennert, P., Mullins, R. F., Brindley, M., Sandersfeld, L. M., Quinn, K., Weller, M., Mccray, P. B., Chiorini, J., & Maury, W. (2011). T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *PNAS*, 108(20), 8426-8431F. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019030108>
- Lee, S.-H., Meng, X. W., Flatten, K. S., Loegering, D. A., & Kaufmann, S. H. (2013). Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death and Differentiation*, 20, 64–76. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.93>
- Li, Z., Brecher, M., Deng, Y.-Q., Zhang, J., Sakamuru, S., Liu, B., Huang, R., Koetzner, C. A., Allen, C. A., Jones, S. A., Chen, H., Zhang, N.-N., Tian, M., Gao, F., Lin, Q., Banavali, N., Zhou, J., Boles, N., Xia, M., ... Li, H. (2017). Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Research*, 27(8), 1046–1064. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.88>
- Liu, Y., Zhang, F., Liu, J., Xiao, X., & Zhang, S. (2014). Transmission-Blocking Antibodies against Mosquito C-Type Lectins for Dengue Prevention. *PLoS Pathog*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003931>
- Lozach, P. Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F. L., & Altmeyer, R. (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32035–32045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402296200>
- Loza-Lay, K. (2019). *Estudio de la interacción del virus de Zika con proteínas de membrana celular* [Tesis de Maestría]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Luo, D., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Research*, 118, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M. P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., & Amara, A. (2012). The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine

- Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host & Microbe*, 12, 544–557.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>
- Miller, J. R., Koren, S., Dilley, K. A., Puri, V., Brown, D. M., Harkins, D. M., Thibaud-Nissen, F., Rosen, B., Chen, X.-G., Tu, Z., Sharakhov, I. V., Sharakhova, M. V., Sebra, R., Stockwell, T. B., Bergman, N. H., Sutton, G. G., Phillippy, A. M., Piermarini, P. M., & Shabman, R. S. (2018). Analysis of the *Aedes albopictus* C6/36 genome provides insight into cell line utility for viral propagation. *GigaScience*, 7(3). <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix135>
- Moreira, J., Peixoto, T. M., Siqueira, A. M., & Lamas, C. C. (2017). Systematic Review Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*, 23, 296.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.027>
- Morelli, F., Souza, R. P., da Cruz, T. E., Damke, G. M. Z. F., Damke, E., Suehiro, T. T., da Silva, V. R. S., & Consolaro, M. E. L. (2020). Zika virus infection in the genital tract of non-pregnant females: A systematic review. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 62). Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062016>
- Motta, I. J. F., Spencer, B. R., Cordeiro da Silva, S. G., Arruda, M. B., Dobbin, J. A., Gonzaga, Y. B. M., Arcuri, I. P., Tavares, R. C. B. S., Atta, E. H., Fernandes, R. F. M., Costa, D. A., Ribeiro, L. J., Limonte, F., Higa, L. M., Voloch, C. M., Brindeiro, R. M., Tanuri, A., & Ferreira, O. C. (2016). Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *New England Journal of Medicine*, 375(11), 1101–1103. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1607262>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487–524.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
- Ojha, C. R., Rodriguez, M., Karuppan, M. K. M., Lapierre, J., Kashanchi, F., & El-Hage, N. (2019). Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. *PLOS ONE*, 14(2), e0208543.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208543>
- Pagani, I., Ghezzi, S., Ulisse, A., Rubio, A., Turrini, F., Garavaglia, E., Candiani, M., Castilletti, C., Ippolito, G., Poli, G., Broccoli, V., Panina-Bordignon, P., & Vicenzi, E. (2017). Human Endometrial Stromal Cells Are Highly Permissive To Productive Infection by Zika Virus. *Scientific Reports*, 7(1), 44286. <https://doi.org/10.1038/srep44286>
- PAHO. (2023). *Zika Subregions*.
https://phip.paho.org/views/Zika_Reg_es/ZikaSubregions/hipguest@wdc.paho.org/MEXICO?:embed=y&:comments=no&:display_count=n&:showVizHome=n&:origin=viz_share_link
- Parra, B., Lizarazo, J., Jiménez-Arango, J. A., Zea-Vera, A. F., González-Manrique, G., Vargas, J., Angarita, J. A., Zuñiga, G., Lopez-Gonzalez, R., Beltran, C. L., Rizcala, K. H., Morales, M. T., Pacheco, O., Ospina, M. L., Kumar, A., Cornblath, D. R., Muñoz, L. S., Osorio, L., Barreras, P., & Pardo, C. A. (2016). Guillain–Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *New England Journal of Medicine*, 375(16), 1513–1523.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1605564>
- Paz-Bailey, G., Rosenberg, E. S., Doyle, K., Munoz-Jordan, J., Santiago, G. A., Klein, L., Perez-Padilla, J., Medina, F. A., Waterman, S. H., Adams, L. E., Lozier, M. J., Bertrán-Pasarell, J.,

- Garcia Gubern, C., Alvarado, L. I., & Sharp, T. M. (2018). Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *New England Journal of Medicine*, 379(13), 1234–1243. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613108>
- Pereira, L., Puerta-Guardo, H., Tabata, T., Petitt, M., Dimitrova, M., Glasner, D. R., & Harris, E. (2020). The Journal of Infectious Diseases Zika Virus Nonstructural Protein 1 Disrupts Glycosaminoglycans and Causes Permeability in Developing Human Placentas. *The Journal of Infectious Diseases*®, 221, 313–337. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz331>
- Perez-Cabezas, V., Ruiz-Molinero, C., Nuñez, B., Nuñez-Moraleda, N., Jesús, J., Jesús Jimenez-Rejano, J., Chilí On-Martinez, R., & Moral-Munoz, J. A. (2019). Guillain-Barre syndrome and Zika infection: identifying leading producers, countries relative specialization and collaboration. *FEMS Microbiology Letters*, 366, 35. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz035>
- Postler, T. S., Beer, M., Blitvich, B. J., Bukh, J., de Lamballerie, X., Drexler, J. F., Imrie, A., Kapoor, A., Karganova, G. G., Lemey, P., Lohmann, V., Simmonds, P., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & Kuhn, J. H. (2023). Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Archives of Virology*, 168(9), 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
- Prisant, N., Bujan, L., Benichou, H., Hayot, P.-H., Pavili, L., Lurel, S., Herrmann, C., Janky, E., & Joguet, G. (2016). Zika virus in the female genital tract. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(9), 1000–1001. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30193-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30193-1)
- Quicke, K. M., Bowen, J. R., Johnson, E. L., McDonald, C. E., Ma, H., O’Neal, J. T., Rajakumar, A., Wrammert, J., Rimawi, B. H., Pulendran, B., Schinazi, R. F., Chakraborty, R., & Suthar, M. S. (2016). Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host & Microbe*, 20(1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>
- Rahimi, N. (2020). C-type Lectin CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN: Cell Adhesion Molecules Turned to Pathogen Recognition Receptors. *Biology*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.3390/biology10010001>
- Sabbah, D. A., Hajjo, R., & Sweidan, K. (2020). Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(10), 815–834. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>
- Sabino, C., Bender, D., Herrlein, M.-L., & Hildt, E. (2021). The Epidermal Growth Factor Receptor Is a Relevant Host Factor in the Early Stages of The Zika Virus Life Cycle In Vitro. *Journal of Virology*, 95(20). <https://doi.org/10.1128/JVI.01195-21>
- Sakkas, H., Bozidis, P., Giannakopoulos, X., Sofikitis, N., & Papadopoulou, C. (2018). An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. *Pathogens*, 7(3), 66. <https://doi.org/10.3390/pathogens7030066>
- Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9/FIGURES/8>

- Sanford, T. J., Mears, H. V, Fajardo, T., Locker, N., & Sweeney, T. R. (2019). Circularization of flavivirus genomic RNA inhibits de novo translation initiation. *Nucleic Acids Research*, 47(18), 9789–9802. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz686>
- Sapparapu, G., Fernandez, estefania, Kose, N., cao, bin, Fox, J., bombardi, robin G., Zhao, H., Nelson, christopher A., bryan, A. L., barnes, T., davidson, edgar, mysorekar, I. U., Fremont, daved H., doranz, benjamin J., diamond, michael S., & crowe Jr, J. (2016). Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nature20564>
- Schiesser, J. V, Loudovaris, T., Thomas, H. E., Elefanty, A. G., & Stanley, E. G. (2021). Integrin $\alpha\beta 5$ heterodimer is a specific marker of human pancreatic beta cells. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87805-8>
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., Horovitz, D. D. G., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., Doriqui, M. J. R., Neri, J. I., Neto, J. M. de P., Wanderley, H. Y. C., Cernach, M., El-Husny, A. S., Pone, M. V. S., Seroa, C. L. C., & Sanseverino, M. T. V. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), 59–62. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>
- Simpson, D. (1964). ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58, 335–338.
- Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2018). The immune response against flaviviruses. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>
- Sobhia, M. E., Ghosh, K., Singh, A., Sul, K., Singh, M., Kumar, R., Sandeep, Merugu, S., & Donempudi, S. (2019). A Multi-Perspective Review on Dengue Research. *Current Drug Targets*, 20(15), 1550–1562. <https://doi.org/10.2174/1389450120666190724145937>
- Song, B.-H., Yun, S.-I., Woolley, M., & Lee, Y.-M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 308, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>
- Srivastava, M., Zhang, Y., Chen, J., Sirohi, D., Miller, A., Zhang, Y., Chen, Z., Lu, H., Xu, J., Kuhn, R. J., & Andy Tao, W. (2020). Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17638-y>
- Stanczyk, N. (2011). *An investigation of DEET-insensitivity in Aedes aegypti*. https://www.researchgate.net/publication/265103119_An_investigation_of_DEET-insensitivity_in_Aedes_aegypti
- Stein, B., Menechino, B., Kato, R. B., Ferreira Franz, H. C., Almeida Da Silva, P. E., Corat, M., Ferreira De Lima Neto, D., Ferreira, D., & Neto, L. (2023). Interactions between DC-SIGN and the envelope protein from Dengue and Zika viruses: a structural perspective based on molecular dynamics and MM/GBSA analyses. *Virology Journal*, 20, 286. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02251-4>

- Stoeckli, E. T. (2004). Ig Superfamily Cell Adhesion Molecules in the Brain. In W. J. Behrens Jürgen and Nelson (Ed.), *Cell Adhesion* (pp. 373–401). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68170-0_12
- Strange, D. P., Jiyarom, B., Pourhabibi Zarandi, N., Xie, X., Baker, C., Sadri-Ardekani, H., Shi, P.-Y., & Verma, S. (2019). Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *MBio*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01372-19>
- Summerford, C., Bartlett, J. S., & Samulski, R. J. (1999). α V β 5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine*, 5(1), 78–82. <https://doi.org/10.1038/4768>
- Takai, T. (2002). *Roles of Fc Receptors in Autoimmunity*. 2. <https://doi.org/10.1038/nri856>
- Talukdar, S., Emdad, L., Das, S. K., & Fisher, P. B. (2020). EGFR: An essential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells. *Advances in Cancer Research*, 147, 161–188. <https://doi.org/10.1016/BS.ACR.2020.04.003>
- Tan, L. Y., Komarasamy, T. V., James, W., & Balasubramaniam, V. R. M. T. (2022). Host Molecules Regulating Neural Invasion of Zika Virus and Drug Repurposing Strategy. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.743147>
- Taylor, A., Foo, S.-S., Bruzzzone, R., Vu Dinh, L., King, N. J. C., & Mahalingam, S. (2015). Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections. *Immunological Reviews*, 268(1), 340–364. <https://doi.org/10.1111/imr.12367>
- Turmel, J. M., Abgueuen, P., Hubert, B., Vandamme, Y. M., Maquart, M., Le Guillou-Guillemette, H., & Leparç-Goffart, I. (2016). Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. *The Lancet*, 387(10037), 2501. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30775-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30775-9)
- van den Berg, B., Walgaard, C., Drenthen, J., Fokke, C., Jacobs, B. C., & van Doorn, P. A. (2014). Guillain–Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nature Reviews Neurology*, 10(8), 469–482. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.121>
- van der Meer, J. H. M., van der Poll, T., & van ‘t Veer, C. (2014). TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood*, 123(16), 2460–2469. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-528752>
- Velandia Myriam L AND Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15, 33–43. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000100006&nrm=iso
- Vukojevic, V., Mastrandreas, P., Arnold, A., Peter, F., Kolassa, I.-T., Wilker, S., Elbert, T., J-F de Quervain, D., Papassotiropoulos, A., & Stetak, A. (2020). Evolutionary conserved role of neural cell adhesion molecule-1 in memory. *Translational Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00899-y>
- Wang, S., Zhang, Q., Tiwari, S. K., Li, W., Furnari, F., & Correspondence, T. M. R. (2020). Integrin avb5 Internalizes Zika Virus during Neural Stem Cells Infection and Provides a Promising Target for Antiviral Therapy. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.020>

- Wu, H., Huang, X.-Y., Sun, M.-X., Wang, Y., Zhou, H.-Y., Tian, Y., He, B., Li, K., Li, D.-Y., Wu, A.-P., Wang, H., & Qin, C.-F. (2023). Zika virus targets human trophoblast stem cells and prevents syncytialization in placental trophoblast organoids. *Nature Communications*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41158-0>
- Xie, S., Zhang, H., Liang, Z., Yang, X., & Cao, R. (2021). AXL, an Important Host Factor for DENV and ZIKV Replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.575346>
- Zanluca, C., Melo, V. C. A. de, Mosimann, A. L. P., Santos, G. I. V. dos, Santos, C. N. D. dos, & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>
- Zhang, X., Liang, C., Wang, H., Guo, Z., Rong, H., Pan, J., Li, W., Pei, R., Chen, X., Zhang, Z., Zhang, X.-E., & Cui, Z. (2022). T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 1 (TIM-1) Is a Functional Entry Factor for Tick-Borne Encephalitis Virus. *MBio*, 13(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.02860-21>
- Zheng, Y., Wang, Q., Xiao, B., Lu, Q., Wang, Y., & Wang, X. (2012). Involvement of Receptor Tyrosine Kinase Tyro3 in Amyloidogenic APP Processing and β -Amyloid Deposition in Alzheimer's Disease Models. *PLoS ONE*, 7(6), e39035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039035>
- Zhu, C., Wei, Y., & Wei, X. (2019). AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1090-3>
- Zhu, Z., Mesci, P., Bernatchez, J. A., Muotri, A. R., Cheresch, D. A., & Rich, J. N. (2020). Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin α v β 5 Axis. *Cell Stem Cell*, 26, 187–204. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.016>
- Zmurko, J., Neyts, J., & Dallmeier, K. (2015). Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. *Reviews in Medical Virology*, 25(4), 205–223. <https://doi.org/10.1002/rmv.1835>

12. ANEXOS

En esta sección se presentan las tablas correspondientes al apartado 9.6, donde se analizan los datos relacionados a la interacción del virus de Zika con células C33-A bajo diferentes condiciones experimentales.

Estas tablas contienen los resultados detallados de los experimentos, incluyendo análisis cuantitativos y estadísticos que respaldan las conclusiones presentadas en el cuerpo principal

del texto. Debido a la extensión de la información, se decidió incluirlas en esta sección para facilitar su consulta y mantener la fluidez del contenido principal.

Estas tablas son fundamentales para entender en profundidad los resultados obtenidos en el apartado 9.6 y complementan los gráficos y análisis discutidos en el texto principal.

• **Tabla 1**

Comparación estadística de la expresión del receptor AXL en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.01. Se incluyen los valores de p correspondientes a las comparaciones entre tiempos (0, 12 y 24 horas) y condiciones (con y sin infección).

PRUEBA AXL MOI 0.01	Valor de p
AXL C/I vs. S/I 0 h	0.0426
AXL C/I vs. S/I 12 h	0.0401
AXL C/I vs. S/I 24 h	0.0028
AXL S/I 0 h vs. 12 h	0.8490
AXL S/I 0 h vs. 24 h	0.0988
AXL S/I 12 h vs. 24 h	0.0804
AXL C/I 0 h vs. 12 h	0.1039
AXL C/I 0 h vs. 24 h	0.1905
AXL C/I 12 h vs. 24 h	0.5000

• **Tabla 2**

Comparación estadística de la expresión del receptor AXL en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.001. Se incluyen los valores de p correspondientes a las comparaciones entre tiempos (0, 12 y 24 horas) y condiciones (con y sin infección).

PRUEBA AXL MOI 0.001	Valor de p
AXL C/I vs. S/I 0 h	0.4768
AXL C/I vs. S/I 12 h	0.9155
AXL C/I vs. S/I 24 h	0.0575
AXL S/I 0 h vs. 12 h	0.7383
AXL S/I 0 h vs. 24 h	0.0949
AXL S/I 12 h vs. 24 h	0.1501
AXL C/I 0 h vs. 12 h	0.5496
AXL C/I 0 h vs. 24 h	0.3573
AXL C/I 12 h vs. 24 h	0.2527

• **Tabla 3**

Comparación estadística de la expresión del receptor AXL en células C33-A entre MOI 0.01 y MOI 0.001. Se muestran los valores de p para las comparaciones entre tiempos (0, 12 y 24 horas) en condiciones infectadas y no infectadas.

PRUEBA AXL MOI 0.01 vs. MOI 0.001	Valor de p
AXL S/I MOI 0.01 vs. 0.001 0 h	0.5000
AXL S/I MOI 0.01 vs. 0.001 12 h	0.0345
AXL S/I MOI 0.01 vs. 0.001 24 h	0.0649
AXL C/I MOI 0.01 vs. 0.001 0 h	0.3088
AXL C/I MOI 0.01 vs. 0.001 12 h	0.1206
AXL C/I MOI 0.01 vs. 0.001 24 h	0.0791

• **Tabla 4**

Comparación estadística de la expresión del receptor TIM-1 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.01. Se presentan los valores de p correspondientes a las comparaciones entre tiempos (0, 12 y 24 horas) y condiciones infectadas y no infectadas.

PRUEBA TIM-1 MOI 0.01	Valor de p
TIM-1 C/I vs. S/I 0 h	0.0291
TIM-1 C/I vs. S/I 12 h	0.2138
TIM-1 C/I vs. S/I 24 h	0.6571
TIM-1 S/I 0 h vs. 12 h	0.2001
TIM-1 S/I 0 h vs. 24 h	0.7251
TIM-1 S/I 12 h vs. 24 h	0.4554
TIM-1 C/I 0 h vs. 12 h	0.0513
TIM-1 C/I 0 h vs. 24 h	0.1417
TIM-1 C/I 12 h vs. 24 h	0.1015

• **Tabla 5**

Comparación estadística de la expresión del receptor TIM-1 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.001. Se incluyen los valores de p para las comparaciones entre tiempos y condiciones evaluadas.

PRUEBA TIM-1 MOI 0.001	Valor de p
TIM-1 C/I vs. S/I 0 h	0.1272
TIM-1 C/I vs. S/I 12 h	0.3939
TIM-1 C/I vs. S/I 24 h	0.5241
TIM-1 S/I 0 h vs. 12 h	0.3063
TIM-1 S/I 0 h vs. 24 h	0.4842
TIM-1 S/I 12 h vs. 24 h	0.5506
TIM-1 C/I 0 h vs. 12 h	0.0185
TIM-1 C/I 0 h vs. 24 h	0.1915
TIM-1 C/I 12 h vs. 24 h	0.2535

• **Tabla 6**

Comparación estadística de la expresión del receptor TIM-1 en células C33-A entre MOI 0.01 y MOI 0.001. Los valores de p muestran las diferencias entre tiempos y condiciones infectadas y no infectadas.

PRUEBA TIM-1 MOI 0.01 vs. MOI 0.001	Valor de p
TIM-1 S/I MOI 0.01 vs. 0.001 0 h	0.3576
TIM-1 S/I MOI 0.01 vs. 0.001 12 h	0.3007
TIM-1 S/I MOI 0.01 vs. 0.001 24 h	0.4627
TIM-1 C/I MOI 0.01 vs. 0.001 0 h	0.5000
TIM-1 C/I MOI 0.01 vs. 0.001 12 h	0.1733
TIM-1 C/I MOI 0.01 vs. 0.001 24 h	0.3063

• **Tabla 7**

Comparación estadística de la expresión del receptor TYRO-3 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.01. Los valores de p reflejan las diferencias entre tiempos y condiciones.

PRUEBA TYRO-3 MOI 0.01	Valor de p
TYRO-3 C/I vs. S/I 0 h	0.0676
TYRO-3 C/I vs. S/I 12 h	0.0689
TYRO-3 C/I vs. S/I 24 h	0.0676
TYRO-3 S/I 0 h vs. 12 h	0.9200
TYRO-3 S/I 0 h vs. 24 h	0.2496
TYRO-3 S/I 12 h vs. 24 h	0.0729
TYRO-3 C/I 0 h vs. 12 h	0.5000
TYRO-3 C/I 0 h vs. 24 h	0.1776
TYRO-3 C/I 12 h vs. 24 h	0.2790

• **Tabla 8**

Comparación estadística de la expresión del receptor TYRO-3 en células C33-A infectadas y no infectadas a una MOI de 0.001. Se muestran las diferencias en los valores de p entre tiempos y condiciones

PRUEBA TYRO-3 MOI 0.001	Valor de p
TYRO-3 C/I vs. S/I 0 h	0.5000
TYRO-3 C/I vs. S/I 12 h	0.5836
TYRO-3 C/I vs. S/I 24 h	0.0001
TYRO-3 S/I 0 h vs. 12 h	0.3928
TYRO-3 S/I 0 h vs. 24 h	0.0706
TYRO-3 S/I 12 h vs. 24 h	0.7822
TYRO-3 C/I 0 h vs. 12 h	0.7528
TYRO-3 C/I 0 h vs. 24 h	0.0001
TYRO-3 C/I 12 h vs. 24 h	0.3415

• **Tabla 9**

Comparación estadística de la expresión del receptor TYRO-3 en células C33-A entre MOI 0.01 y MOI 0.001. Los valores de p indican diferencias entre tiempos y condiciones infectadas y no infectadas.

PRUEBA TYRO-3 MOI 0.01 vs. MOI 0.001	Valor de p
TYRO-3 S/I MOI 0.01 vs. 0.001 0 h	0.0498
TYRO-3 S/I MOI 0.01 vs. 0.001 12 h	0.1503
TYRO-3 S/I MOI 0.01 vs. 0.001 24 h	0.1762
TYRO-3 C/I MOI 0.01 vs. 0.001 0 h	0.5000
TYRO-3 C/I MOI 0.01 vs. 0.001 12 h	0.8907
TYRO-3 C/I MOI 0.01 vs. 0.001 24 h	0.3363