



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR**

Estudio comparativo de la infección por los virus de Zika, dengue y fiebre amarilla en células HTR8 (trofoblastos de placenta humana) y macrófagos M2 (células de Hofbauer like).

TESIS

Que presenta

M. Sc. MERCEDES ISABEL VIETTRI PINTO

**Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
EN**

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de Tesis:

DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN

Ciudad de México.

Diciembre, 2022.

COMITÉ ASESOR

DRA. PATRICIA TALAMÁS ROHANA.

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN.

DRA. ABIGAIL BETANZOS FERNÁNDEZ.

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN.

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE.

Departamento de Biomédicina Molecular. CINVESTAV-IPN.

DRA. GUADALUPE ESTRADA GUTIÉRREZ

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer).

FINANCIAMIENTO

Esta tesis de doctorado fue realizada en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV, específicamente en el Laboratorio 10 de Virología bajo la conducción del Dr. Juan Ernesto Ludert León. Durante la ejecución de este proyecto de investigación se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca de doctorado: número de registro CVU 940867 y número de matrícula del CINVESTAV 181220023. Este proyecto también fue financiado por el ICGEB (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology*), número de contrato CRP/17/009 y referencia CRP/MEX17-02.

Agradezco, a CONACYT por la beca otorgada para realizar el doctorado en el Padrón Nacional de Postgrados de Calidad.

DEDICATORIA

Dedico este triunfo a DIOS, padre omnipotente, quien me acompaña en cada paso del camino y me da la fortaleza para seguir adelante, aun en los momentos más difíciles.

A mis padres José Francisco Viettri Ramírez y Ana Mercedes Pinto García, por ser el motor que impulsa mi vida. Todo lo que soy y lo que seré se lo debo por completo a ustedes, los amo.

A mi hermano Marcos Alfonso Viettri Pinto, por ser mi amigo, confidente y apoyo incondicional. Eres la persona que más admiro en este mundo, te amo inmensamente.

Finalmente, a todos los seres queridos que han partido de este plano terrenal y que han formado parte importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y amigo el Dr. Juan Ernesto Ludert León por creer en mí y darme la oportunidad de formarme en su laboratorio. Lo considero un padre en esta tierra tan lejos de mi hogar y siempre gozará de mi eterna admiración. “Lo quiero más que una arepa con queso y café con leche”.

A los Dres. y amigos: Elizabeth Ferrer, Daría Camacho y Guillermo Comach por su apoyo y recomendaciones para entrar al programa de doctorado.

A mis asesores: Dra. Patricia Talamás, Dra. Abigail Betanzos, Dra. Guadalupe Estrada, Dr. Vianney Ortiz y Dr. Porfirio Nava, por su invaluable apoyo y asesoría en la ejecución de este proyecto de investigación.

Al CINVESTAV y a todo el personal del Dpto de Infectómica y Patogénesis Molecular (auxiliares, técnicos y secretarías); en especial al Dr. Raymundo Cruz Pérez, Irmita Miranda y Oscar Casas a quienes considero compañeros y amigos.

Al colegio de profesores del DIPM, quienes representan un modelo de ética, compromiso y profesionalismo digno de seguir. Un agradecimiento especial, a la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano “la mejor coordinadora académica del mundo mundial”.

Al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) y en especial a la Dra. Aurora Espejel Núñez por su apoyo y disposición desde el inicio de este proyecto, le estaré eternamente agradecida.

A los Dres. y hermanos de vida Romel Rosales y Gerson Caraballo por su amistad, confianza y por todos los conocimientos que compartieron conmigo, los quiero “hasta el infinito y más allá”.

A mis panitas: Johseis Licett “el gatito”, Fabiola Mora “la defensora”, Georgina Tahan “la terrorista”, Marielys Gómez “la enfermiza”, Jenny González “la eterna risa” y Víctor Pardines “el adoptado”. Más que amigos los considero hermanos y mi familia en México, los amo.

A mis amigos: Fernando “mi hermanito”, Arely, Juanito, Adán, César, Ángel, Edgar, Elenita, Irving, Dr. Jonapa, Dayana, Esly, Saraí, Charlie y Noe. Compañeros de alegrías, angustias y frustraciones, ocupan un lugar muy especial en mi corazón. Gracias por su amistad y tantas anécdotas compartidas.

Finalmente, pero no menos importante, a México, este increíble país que me abrió sus puertas y me cautivo con su gente, su cultura y su gastronomía.

INDICE

RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades del género Flavivirus.....	1
1.1.1 Ciclo de replicación del género Flavivirus.....	2
1.1.2 Epidemiología de flavivirus de importancia clínica.....	4
1.2 Virus del Zika (historia y propagación).....	6
1.2.1 Síndrome congénito asociado a Zika (SCZ)	7
1.2.3 Arquitectura de la placenta.....	8
1.2.4 Rutas usadas por ZIKV para cruzar la barrera hematoplacentaria.....	10
1.3 Blanco mecanístico de rapamicina en mamíferos (mTOR) y su modulación en la infección por flavivirus.....	13
1.4 Inmunidad innata en la infección por ZIKV.....	16
II. JUSTIFICACIÓN	17
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS.....	19
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Líneas celulares.....	21
6.2. Cepas virales	21
6.3. Cultivo primario de células de Hofbauer.....	21
6.4. Diferenciación de células U937-DC-SIGN a macrófagos M2 (MØ-M2)	23
6.5. Microscopía de epifluorescencia	23
6.6. Citometría de flujo	24
6.7. Curvas de replicación en un paso	24
6.8. Titulación viral por ensayo de foco	25
6.9. Cuantificación de porcentaje de células infectadas	25
6.10. Caracterización de la polaridad de células HTR8.....	26
6.11. Cinética de infección en sistema de cultivos Transwells®.....	26
6.12. Ensayo de Western blot para medir la activación de mTOR en células HTR8.....	27
6.13. Tratamiento con inhibidores de mTOR y viabilidad celular	28

6.14. Efecto de la inhibición de mTOR en la progenie viral en células HTR8	28
6.15. Perfil de citocinas inducido en células HTR8 y MØ-M2 infectados	29
6.16. Análisis estadístico	29
VII. RESULTADOS.....	30
7.1. Cultivo primario de células de Hofbauer	30
7.2. Caracterización de macrófagos M2 y células HTR8	30
7.3. Cinéticas de infección viral en células HTR8 y macrófagos M2.....	34
7.4. Porcentajes de infección en células HTR8 y macrófagos M2	35
7.5. Progenie viral en células HTR8 y macrófagos M2.....	35
7.6. Cinética de infección viral en un sistema de co-cultivo de células HTR8 y MØ-M2	36
7.7. Activación diferencial de la maquinaria mTOR en células HTR8 infectadas	39
7.8. Inhibición de la maquinaria mTOR en células HTR8 infectadas	41
7.9. Perfil de secreción de citocinas en células HTR8 y macrófagos M2.....	45
VIII. DISCUSIÓN	53
IX. CONCLUSIONES	61
X. PERSPECTIVAS.....	62
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
XII. ANEXOS.....	72
12.2 Aprobación del proyecto de colaboración con el INPer	74
12.3 Consentimiento informado para la donación de placentas humanas	75
12.4 Productos científicos.....	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura y genoma del género Flavivirus.....	2
Figura 2: Receptores celulares de interacción con la proteína E del género Flavivirus.	3
Figura 3: Ciclo de replicación del género Flavivirus.	4
Figura 4: Distribución global de la transmisión por mosquitos del género Aedes de ZIKV, DENV y YFV.	6
Figura 5: Manifestaciones clínicas del Síndrome Congénito asociado a Zika (SCZ).	8
Figura 6: Estructura y composición celular de la placenta humana.	9
Figura 7: Transmisión vertical de ZIKV a través de deciduas maternas infectadas.....	11
Figura 8: Transmisión vertical de ZIKV media por transcitosis con anticuerpos anti-DENV..	12
Figura 9: Modelo de transmisión vertical de ZIKV a través de la ruta paracelular.	13
Figura 10: Esquema de señalización de mTORC1 y mTORC2 con las proteínas asociadas, sustratos y funciones de cada complejo.....	15
Figura 11: Diagrama resumen de la estrategia experimental.	20
Figura 12: Esquema del protocolo de obtención de cultivo primario de HBCs.	22
Figura 13: Esquema de infección en sistema de cultivos Transwells®.	27
Figura 14: Células de Hofbauer (HBCs) aisladas de placentas humanas a término.....	30
Figura 15: Diferenciación de células U937-DC-SIGN a MØ-M2.	31
Figura 16: <i>Dot plot</i> de SSC-A /FSC-A de células U937 tratadas con PMA y M-CSF.	32
Figura 17: Expresión de los receptores DC-SIGN, CD14 y CD163 en células U937 diferenciadas a MØ-M2 y células HTR8.....	33
Figura 18: Cinética de replicación viral en células HTR8 y MØ-M2 infectados.....	34
Figura 19: Porcentajes de infección en células HTR8 y MØ-M2.	35
Figura 20: Tinción de células Caco-2 y HTR8 con BODI-PY.....	37
Figura 21: Expresión de las proteínas Ocludina y ZO-1 en células Caco-2 y HTR8.....	38
Figura 22: Velocidad de infección de MØ-M2 en co-cultivo con células HTR8 infectadas. ...	39
Figura 23: Activación de mTORC1 en células HTR8 infectadas.	40
Figura 24: Activación de mTORC2 en células HTR8 infectadas.	41
Figura 25: Viabilidad de células HTR8 tratadas con inhibidores de mTOR.....	42
Figura 26: Ensayos de WB que evidencian el efecto de la inhibición de la vía mTOR sobre la expresión de NS3.....	43
Figura 27: Efecto del tratamiento con Rapamicina y AZD8055 sobre la inhibición de la vía mTOR y la expresión de NS3.....	44
Figura 28: Efecto de la inhibición de la vía mTOR sobre la progenie viral.....	45
Figura 29: Perfil de citocinas, quimiocinas e interferones secretado por células HTR8 infectadas con los diferentes flavivirus.....	49
Figura 30: Perfil de citocinas, quimiocinas e interferones secretado por MØ-M2 infectados con los diferentes flavivirus.	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Células de las microvellosidades placentarias susceptibles a infección por ZIKV.....	10
Tabla 2: Proteínas señalizadoras que regulan la activación de la maquinaria mTOR.....	14
Tabla 3: Rendimiento de virus por célula infectada (HTR8 y M2-MØ).....	36
Tabla 4: Perfil de citocinas, interferones y quimiocinas secretado por células HTR8 infectadas con los diferentes flavivirus.....	47
Tabla 5: Perfil de citocinas, interferones y quimiocinas secretado por MØ-M2 infectados con los diferentes flavivirus.	50

RESUMEN

El virus de Zika (ZIKV) es un patógeno neurotrópico con alto potencial teratogénico, causante del síndrome congénito asociado a Zika (SCZ), el cual se caracteriza por generar abortos y malformaciones congénitas a nivel neurológico. En las microvellosidades placentarias, las células sincitiotrofoblásticas (STB) son refractarias a la infección por ZIKV. Mientras que los citotrofoblastos (CTB) y las células de Hofbauer (HBCs), sí son susceptibles. Otros flavivirus relacionados filogenéticamente como el virus del dengue (DENV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV), no se han asociado con transmisión vertical. Actualmente, los mecanismos utilizados por ZIKV para cruzar la barrera hematoplacentaria son desconocidos y representan un enigma que es urgente descifrar, en virtud del impacto social y el problema de salud pública que encarna el SCZ. En este estudio comparativo se evaluó la infección con ZIKV (linaje africano y asiático), DENV serotipo-2 y YFV-17D (cepa vacunal), en términos de eficiencia de infección, activación de mTOR y perfil de citocinas secretadas por células HTR8, utilizadas como modelo de CTB y células U937-DC-SING, diferenciadas a MØ-M2 como modelo de HBCs. Los resultados indican que ambos linajes de ZIKV se replican más eficientemente que DENV-2 y YFV-17D en células HTR8. En MØ-M2 se observó el mismo patrón de infección, aunque con diferencias menos marcadas. Con relación a la activación de la maquinaria mTOR, se evidenció mayor expresión de las fracciones fosforiladas de mTORC1 (S6r) y mTORC2 (AKT/Ser473) en células HTR8 infectadas con las cepas de ZIKV. Asimismo, el tratamiento de estas células con rapamicina y AZD8055 resultó en la disminución de la expresión de NS3 y de la progenie viral en todos los casos de infección. La replicación viral fue más afectada en las infecciones por ZIKV con disminución de los títulos virales de 19 veces, frente a 5 y 3.5 para DENV-2 y YFV-17D, respectivamente. Finalmente, el perfil de citocinas secretado indicó que en células HTR8 la infección por ZIKV induce una respuesta inflamatoria y quimiotáctica limitada con bajos niveles de IFNs α/γ , en contraste con lo observado en las infecciones por DENV-2 y YFV-17D. En MØ-M2 ambos linajes de ZIKV también se caracterizan por inducir una baja respuesta de IFNs. Estos resultados sugieren que los CTB juegan un rol importante en el establecimiento de ZIKV en el lumen de las microvellosidades placentarias, siendo capaces de limitar la replicación de DENV y YFV, pero no de ZIKV. Asimismo, la maquinaria mTOR funciona como un máster “*switch*” que favorece la replicación de ZIKV en los CTB.

ABSTRACT

Zika (ZIKV) is a neurotropic virus with high teratogenic potential, causing Congenital Zika Syndrome (CZS), which is characterized by miscarriages and congenital malformations at the neurological level. In the placental microvilli, syncytiotrophoblastic cells (STB) are refractory to ZIKV infection, while cytotrophoblasts (CTB) and Hofbauer cells (HBC) are susceptible. Other phylogenetically related flaviviruses, such as dengue virus (DENV) and yellow fever virus (YFV), have not been associated with vertical transmission. Currently, the mechanisms used by ZIKV to cross the blood-placental barrier are unknown and represent an enigma that requires urgent deciphering, due to the social impact and public health problem that CZS embodies. In this comparative study, infection with ZIKV (African and Asian lineages), DENV serotype-2, and YFV-17D (vaccine strain) was evaluated in terms of infection efficiency, mTOR activation, and profile of secreted cytokines in HTR8 cells, used as a model of CTBs and U937-DC-SING cells differentiated to MØ-M2, used as a model of HBCs. The results indicate that both ZIKV lineages replicate more efficiently than DENV-2 and YFV-17D in HTR8 cells. In MØ-M2 the same pattern of infection was observed, although with less marked differences. Regarding the activation of the mTOR machinery, higher expression of the phosphorylated fractions of mTORC1 (S6K1) and mTORC2 (AKT/Ser473) was observed in HTR8 cells infected with both ZIKV lineage. Likewise, the treatment of these cells with Rapamycin and AZD8055 resulted in a decrease in the expression of NS3 and viral progeny in all cases of infection. Viral replication was more affected in ZIKV infections with a 19-fold decrease in viral titers, compared to 5-fold and 3.5-fold for DENV-2 and YFV-17D, respectively. Finally, the profile of secreted cytokines indicated that ZIKV infection induces a limited inflammatory and chemotactic response with low levels of IFNs α/γ in HTR8 cells, in contrast to that observed in DENV-2 and YFV-17D infections. In MØ-M2, both ZIKV lineages are also characterized by inducing a low IFNs response. These results suggest that CTB play an important role in the establishment of ZIKV in the core of the placental microvilli, being able to limit the replication of DENV and YFV, but not ZIKV. Likewise, the mTOR machinery works as a master switch that favors ZIKV replication in CTB.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del género *Flavivirus*

Los flavivirus son virus de ARN monocatenario de polaridad positiva, pertenecientes a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* (García-Blanco *et al.*, 2016; Holbrook, 2017; Musso y Gubler, 2016). Este género incluye a los arbovirus de mayor importancia clínica, tales como el virus del Zika (ZIKV), el virus del dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV), entre otros (Bharucha y Breuer, 2016; García-Blanco *et al.*, 2016; Holbrook, 2017; Pierson y Diamond, 2020). ZIKV, DENV y YFV convergen en varias características biológicas y estructurales que incluyen similitud filogenética, vector transmisor y nichos epidemiológicos (Apte-Sengupta *et al.*, 2014; Holbrook, 2017; Lindenbach y Rice, 2003; Musso y Gubler, 2016).

Estructuralmente, la partícula viral de los flavivirus presenta simetría icosaédrica, mide aproximadamente 50 nm de diámetro y está envuelta por una membrana lipídica, donde se ubican las proteínas estructurales de envoltura (E) y membrana (M). La membrana lipídica recubre a la nucleocápside, la cual está formada por múltiples copias de la proteína de la cápside (C) y en su interior contiene al material genético (Apte-Sengupta *et al.*, 2014; García-Blanco *et al.*, 2016; Lindenbach y Rice, 2003). El genoma viral como se mencionó anteriormente consiste en una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva, posee una estructura caperuza en su extremo 5' y carece de cola de poli-A en su extremo 3'. La secuencia nucleotídica mide de 10 a 11 Kb y codifica una poliproteína de 3,400 aa aproximadamente, conformada por tres péptidos estructurales (C, prM/M y E) en su extremo N-terminal, seguido de siete péptidos no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) relacionados con funciones de replicación y ensamblaje de la partícula viral, además de modulación de la inmunidad innata celular (**Figura 1**) (Apte-Sengupta *et al.*, 2014; García-Blanco *et al.*, 2016; Pierson y Diamond, 2020; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

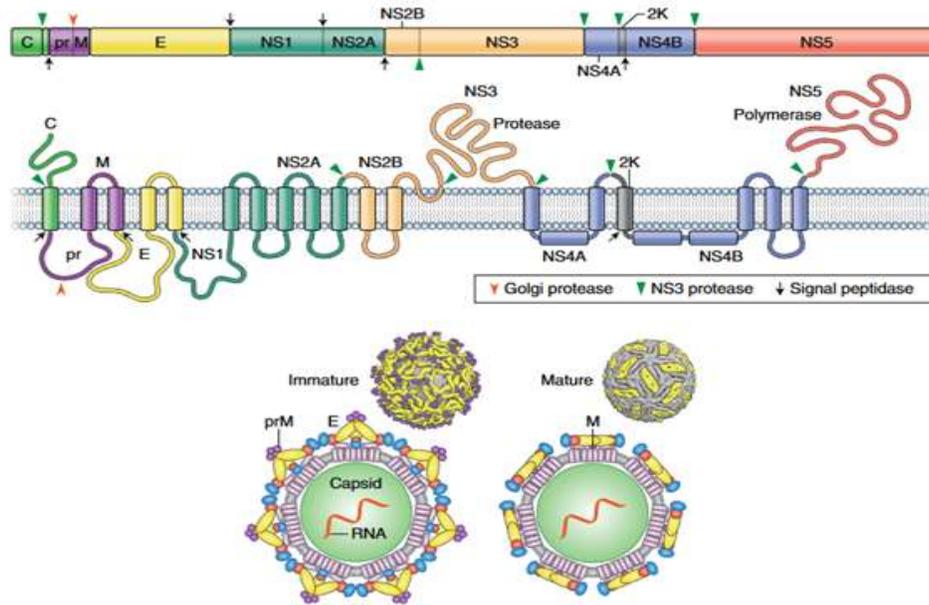


Figura 1: Estructura y genoma del género *Flavivirus*.
Tomado de: Pierson y Diamond, (2020).

1.1.1 Ciclo de replicación del género *Flavivirus*.

El ciclo de replicación de los flavivirus inicia con la adhesión de la partícula viral a la superficie de la célula, a través del reconocimiento antigénico entre la proteína E y receptores de la membrana celular, tales como: proteínas tirosina cinasa de la familia TAM (AXL y TYRO3), inmunoglobulinas de células T receptoras de fosfatidilserina (TIM-1 y TIM-4), lectinas tipo C (DC-SIGN, L-SIGN y manosa), proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90 y GRP78), integrinas y heparán sulfato, entre otros correceptores de entrada viral (**Figura 2**) (Fishburn *et al.*, 2022; Oliveira y Perón, 2019). Posterior a la adhesión, ocurre la entrada, del virión vía endocitosis mediada por proteínas clatrina. En el citosol, la vesícula endosomal sufre disminución de pH, produciendo cambios conformacionales en la proteína E, lo que permite la fusión de la membrana endosomal con la membrana del virión, liberando el genoma viral al citoplasma (Apte-Sengupta *et al.*, 2014; Pierson y Diamond, 2020; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

El genoma viral al ser un ARN monocatenario no segmentado y de polaridad (+) es directamente traducido en los ribosomas. La proteína naciente en su porción N-terminal posee una señal de localización en el retículo endoplasmático (RE), que promueve la asociación de los ribosomas que traducen el ARN viral con las membranas del RE, dando como resultado la inserción de la poliproteína recién sintetizada en su membrana. La

poliproteína es procesada en péptidos individuales por la acción de las proteasas virales (NS2B y NS3) en el lado citoplasmático y proteasas celulares presentes en el lumen del RE (Apte-Sengupta *et al.*, 2014; García-Blanco *et al.*, 2016; Pierson y Diamond, 2020). Por acción de las proteínas (NS4A y NS4B), se forman los paquetes vesiculares en la membrana del RE originando los complejos de replicación (Chatel-Chaix y Bartenschlager, 2014). Allí en los complejos de replicación, se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción del ARN genómico de polaridad (+), en un ARN genómico de polaridad (-), que sirve de plantilla para producir múltiples copias de ARN (+). La progenie de ARN (+), puede reclutarse para ciclos adicionales de traducción, replicación o incorporarse en los viriones, los cuales inician su ensamblaje en la membrana del RE. Los viriones recién ensamblados ingresan a la red del aparato de Golgi y viajan a través de vesículas de transporte, experimentando maduración en el camino. A nivel del trans-Golgi, la proteína PrM es cortada por una proteasa residente de Golgi llamada furina, lo cual genera la forma madura de la proteína M, requerida para la infectividad del virión. Finalmente, las partículas virales maduras e infectivas son liberadas al medio extracelular, al igual que la proteína NS1 (Figura 3) (Apte-Sengupta *et al.*, 2014; Fishburn *et al.*, 2022; García-Blanco *et al.*, 2016; Sager *et al.*, 2018; Pierson y Diamond, 2020; Viettri *et al.*, 2022). La **Figura 3** muestra un esquema del ciclo de replicación de los flavivirus.

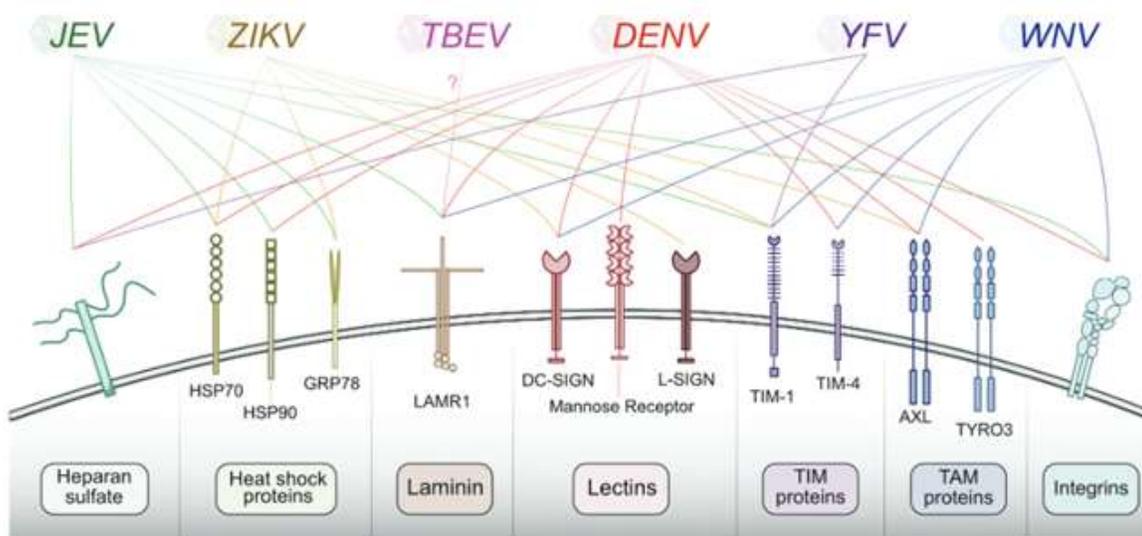


Figura 2: Receptores celulares de interacción con la proteína E del género Flavivirus.
Tomada de: Fishburn *et al.*, (2022).

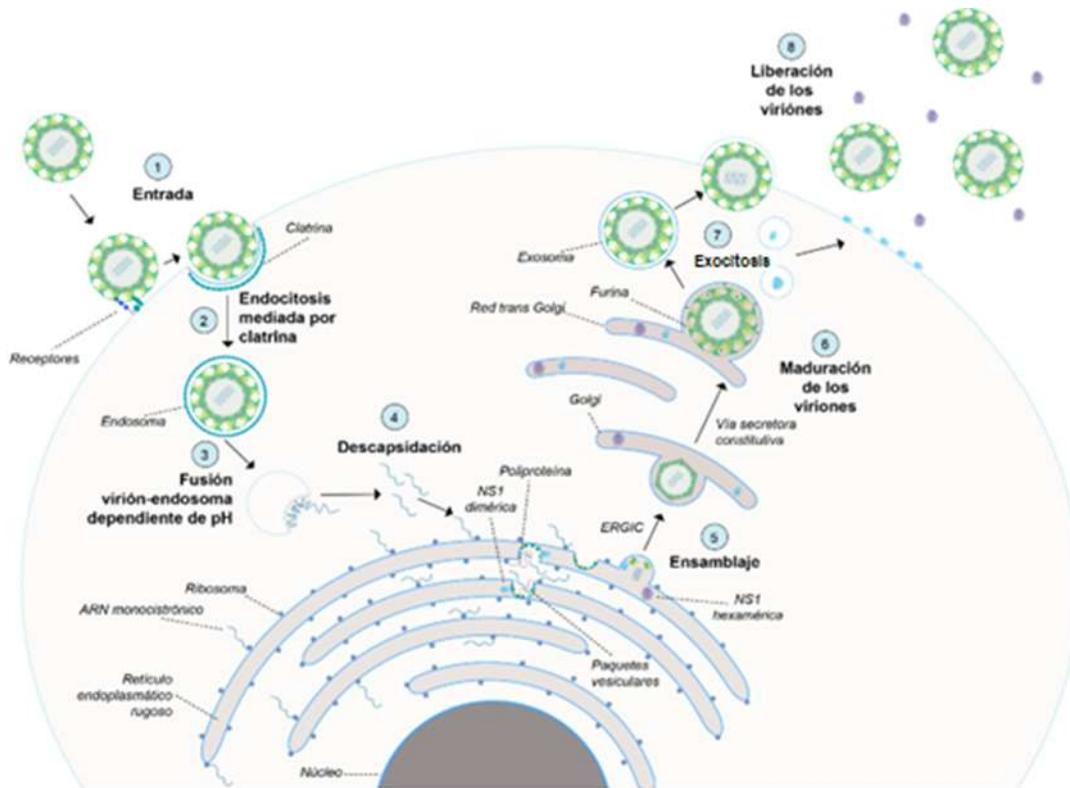


Figura 3: Ciclo de replicación del género Flavivirus.
Tomado de: Viettri et al., (2022).

1.1.2 Epidemiología de flavivirus de importancia clínica

El género *Flavivirus* comprende más de 60 especies e incluye a muchos de los arbovirus de mayor importancia clínica en el mundo. El potencial epidémico de estos virus depende de las características biológicas de sus vectores, la invasión de nichos ecológicos y la globalización que favorecen su propagación geográfica (Higuera y Ramírez, 2019; Pierson y Diamond, 2020). ZIKV, DENV y YFV son transmitidos por la picadura de hembras hematófagas pertenecientes al género *Aedes*, siendo la especie *Ae. aegypti* la de mayor pertinencia epidemiológica (**Figura 4**) (Boyer et al., 2018; Goenaga et al., 2012; Gubler, 1998; Huang et al., 2014; Pierson y Diamond, 2020).

El DENV es endémico en más de 129 países de zonas tropicales y subtropicales, por lo que es considerado el arbovirus con mayor dispersión a nivel mundial con una incidencia anual superior a los 400 millones de casos (WHO, 2022). Se han identificado cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) de este virus y la infección por cualquiera de ellos cursa de forma asintomática o como un síndrome febril agudo,

caracterizado por fiebre elevada, dolor de cabeza, dolor retroorbital, mialgias, artralgias, náuseas y petequias. Sin embargo, la infección puede evolucionar a dengue grave o hemorrágico y ser mortal (Gubler, 1998; Holbrook, 2017; Muller *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2017).

Con relación a YFV, éste es endémico en zonas tropicales de África, América Central y Sur América, con reportes alrededor de los 200 mil casos y 30 mil muertes anuales (WHO, 2019). La infección puede ser subclínica o inespecífica con síntomas agudos como fiebre, náuseas, vómitos, cefaleas, mialgias y dolor epigástrico. Los casos graves de la infección cursan con hepatitis, ictericia, insuficiencia renal, hemorragia y shock hipovolémico, llegando a ser fatal entre el 20 y 60% de los casos (Carrington & Auguste, 2013; Higuera y Ramírez, 2019; Holbrook, 2017; Huang *et al.*, 2014). Afortunadamente, en la actualidad se cuenta con una vacuna efectiva que confiere inmunidad de por vida contra YFV (Keller-Stanislawski *et al.*, 2014; Suzano *et al.*, 2006).

La transmisión vectorial de ZIKV se ha reportado en 86 países de África, Centroamérica y Suramérica. Entre el 2015 – 2016 se notificó la epidemia de las Américas y el Caribe con registros entre 440 mil y 1.3 millones de casos (Hennessey *et al.*, 2016; Musso y Gubler, 2016; PAHO, 2022). La infección por ZIKV al igual que DENV y YFV puede cursar de forma asintomática o como una infección autolimitada con síntomas de fiebre, sarpullido, artralgias y conjuntivitis. La gravedad de la infección por ZIKV se debe a sus complicaciones como los síndromes de Guillain-Barré y el Zika congénito (SCZ) (Musso y Gubler, 2016; Musso *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2015; Plourde y Bloch, 2015; Possas, 2016). Se han descrito dos linajes de ZIKV, uno de origen africano, asociado con mayor virulencia en células de cultivo y en animales de experimentación (Shao *et al.*, 2017; Sheridan *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2018; Aubry *et al.*, 2021; Tesla *et al.*, 2022), y otro de origen asiático, el cual hasta el presente es el responsable de las infecciones y brotes en humanos (Hill *et al.*, 2019; Musso *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Jiolle *et al.*, 2021).

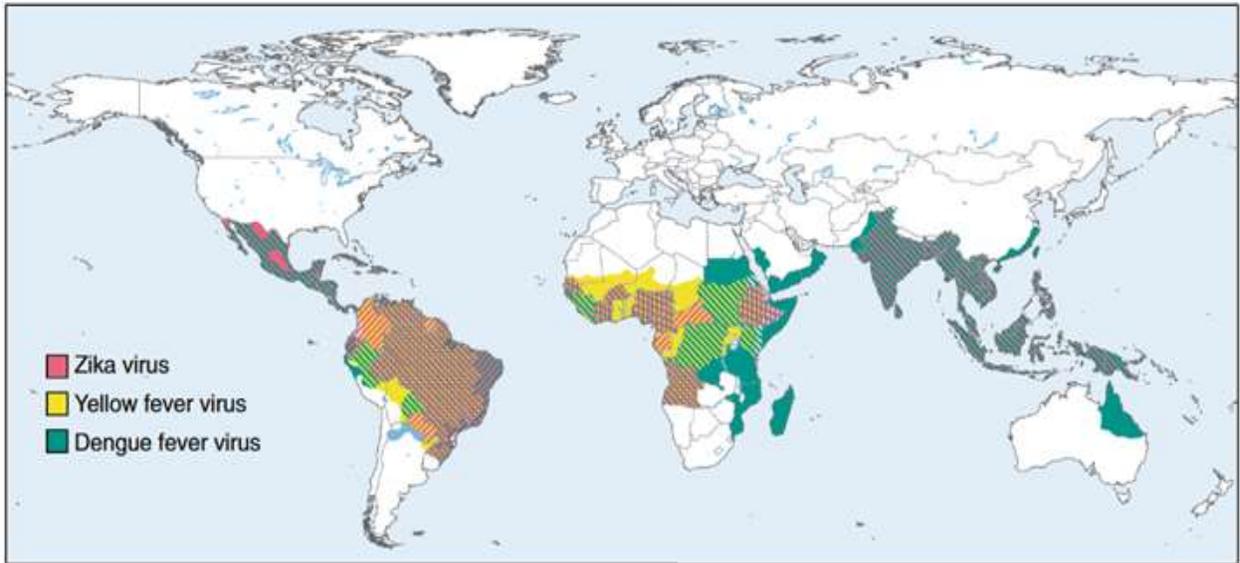


Figura 4: Distribución global de la transmisión por mosquitos del género *Aedes* de ZIKV, DENV y YFV. Tomada de: Pierson y Diamond, (2020).

1.2 Virus del Zika (historia y propagación)

El ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 de los bosques de Zika (Uganda) a partir de un ejemplar febril de la especie *Macaca mulatta*, también conocido como macaco *Rhesus* y de mosquitos de la especie *Ae. africanus*. Desde su aislamiento, solo se registraron casos esporádicos de infección en humanos en África, Asia y Oceanía (Bharucha y Breuer, 2016; Dick *et al.*, 1952; Higuera y Ramírez, 2019; Musso y Gubler, 2016; Plourde y Bloch, 2016).

En 2007 se reporta la primera epidemia causada por el virus, la cual tiene lugar en la isla de Yap (Estados Federados de Micronesia). Posteriormente, la infección por ZIKV se propagó rápidamente, registrándose brotes en varias islas del océano Pacífico (Polinesia Francesa, Islas Cook, Isla de Pascua y Nueva Caledonia). En mayo del 2015, luego de la aparición del primer caso autóctono reportado en Brasil, la OPS (Organización Panamericana de la Salud) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) emiten una alerta epidemiológica sobre el riesgo de propagación del virus y confirman casos autóctonos en varios países de Latinoamérica (El Salvador, Guatemala, México, Paraguay, Surinam y Venezuela) (Bharucha y Breuer, 2016; Musso y Gubler, 2016; Plourde y Bloch, 2016; Possas, 2016). En México entre 2015 y 2021, se han registrado un total de 12,991 casos autóctonos, siendo las entidades federativas de Veracruz y Yucatán las que reportaron mayor índice de prevalencia (SINAVE/DGE/SS, 2021).

La transmisión del ZIKV en humanos ocurre principalmente por la vía vectorial (Aubry *et al.*, 2021; Dick *et al.*, 1952; Jiolle *et al.*, 2021). Sin embargo, se han descrito otras vías de transmisión como son la vía perinatal, la transfusional y la sexual (Bharucha y Breuer, 2016; Counotte *et al.*, 2018; De Carvalho *et al.*, 2016; Musso *et al.*, 2014, 2017).

1.2.1 Síndrome congénito asociado a Zika (SCZ)

La infección por ZIKV adquiere relevancia en salud pública por su capacidad de atravesar la barrera hematoplacentaria y su alto potencial teratogénico, que incluye a este virus dentro de la lista de patógenos TORCH (Coyne y Lazear, 2016; Arora *et al.*, 2017, Freitas *et al.*, 2020). El término TORCH es un acrónimo de los agentes infecciosos (Toxoplasmosis, Otros, Rubeola, CMV y HIV) que abarca a todos aquellos microorganismos con capacidad teratogénica transmitidos verticalmente de la madre al producto durante el embarazo, el parto o la lactancia materna (Koi *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 2010). No obstante, otros flavivirus como DENV y YFV a pesar de su estrecha relación filogenética y epidemiológica con ZIKV, no se han asociado con daño teratogénico (Keller-Stanislawski *et al.*, 2014; Suzano *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2017).

La infección por ZIKV en mujeres gestantes durante el primer trimestre de gestación, puede afectar al feto durante su desarrollo, generando abortos, malformaciones del SNC (microcefalia, anencefalia e hidrocefalia), anomalías oculares, contracturas congénitas, neonatos con bajo peso y trastornos del desarrollo psicomotor a largo plazo (**Figura 5**) (Coelho y Crovella, 2017; Musso *et al.*, 2019; Possas, 2016; Quicke *et al.*, 2016; Rasmussen *et al.*, 2016). La asociación de estas manifestaciones clínicas con la infección por ZIKV durante la gestación, ha sido demostrada por la detección de ARN viral en líquido amniótico y en tejido cerebral de mortinatos (Driggers *et al.*, 2016; Quicke *et al.*, 2016). En las microvellosidades placentarias de neonatos con microcefalia, también se ha detectado la presencia de ARN viral en citotrofoblastos (CTB) y en macrófagos placentarios (HBCs, células de Hofbauer) (Noronha *et al.*, 2016; Quicke *et al.*, 2016). Asimismo, se ha reportado positividad para anticuerpos IgM específicos contra ZIKV en el fluido cerebroespinal de neonatos con microcefalia (Cordeiro *et al.*, 2016). Estas evidencias, en conjunto con los datos epidemiológicos de los brotes registrados tanto en la Polinesia Francesa como en Latinoamérica, permitieron asociar la infección por ZIKV con las complicaciones fetales,

identificando una nueva patología causada por flavivirus, llamada Síndrome Congénito asociado a Zika (SCZ) (Arora *et al.*, 2017; Coyne y Lazear, 2016; Dos Santos *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2020; Posas, 2016). En Latinoamérica, las cifras más alarmantes de SCZ fueron reportadas en Brasil con 550 casos confirmados solo en el año 2016 (Dos Santos *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2020; Posas, 2016). En México entre 2016-2021 se registraron un total de 56 casos (DGE, 2021). Es importante destacar que solo el 30% de las mujeres que contraen infección por ZIKV durante el embarazo desarrollan esta complicación, guardando relación con la etapa gestacional, carencias nutricionales y deficiencias del sistema inmune (Dos Santos *et al.*, 2019; Martinez-Viedma y Pickett, 2018; Musso y Baud, 2019).

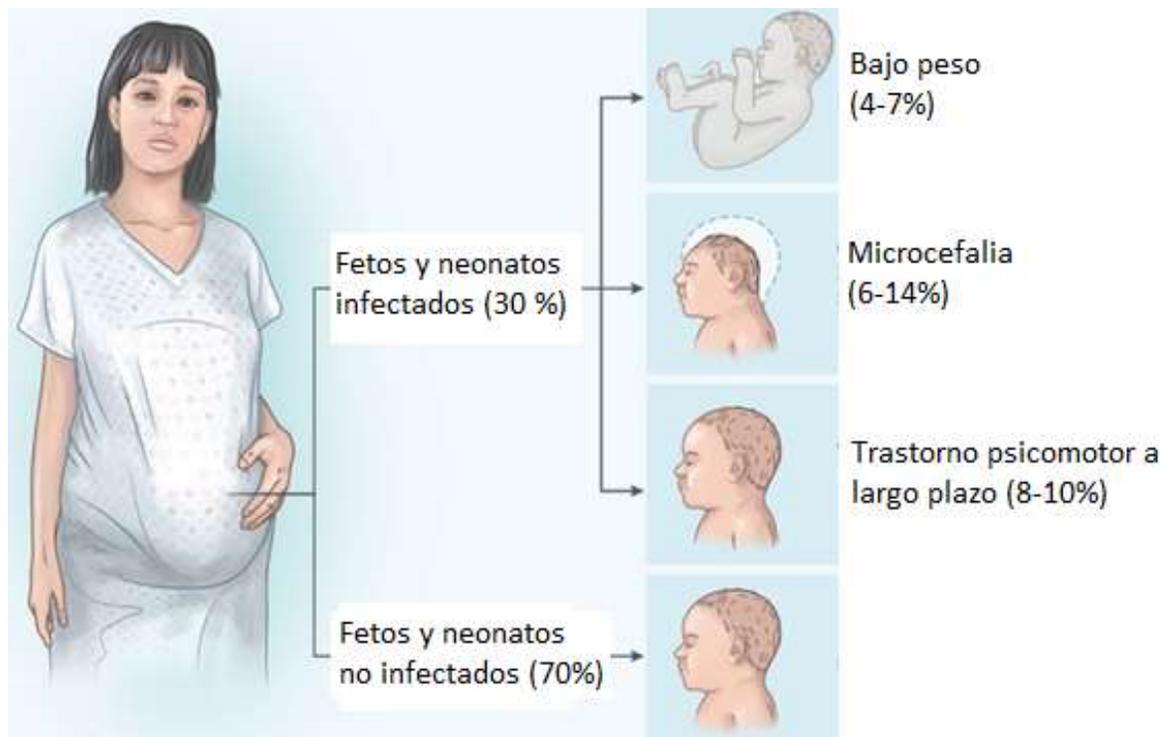


Figura 5: Manifestaciones clínicas del Síndrome Congénito asociado a Zika (SCZ).
Modificada de: Musso y Baud, (2019).

1.2.3 Arquitectura de la placenta

La placenta humana es un tejido hemocorial que permite el contacto directo del epitelio coriónico de las microvellosidades con el lecho sanguíneo materno (Ander *et al.*, 2019; Arora *et al.*, 2017). Esto favorece el transporte de nutrientes, metabolitos, oxígeno y electrolitos, así como también, el intercambio de efectores inmunológicos innatos y adaptativos (inmunoglobulinas maternas) entre la madre y el feto (Ander *et al.*, 2019; Cross, 1998). Las

microvellosidades placentarias están compuestas por células fetales principalmente trofoblastos derivados del feto en estrecha asociación con tejidos maternos (Cross, 1998; Leach y Firth, 1997). En humanos y otros organismos euterios, la interfaz materno-fetal consiste en dos capas de células progenitoras trofoblásticas derivadas del feto: i) la capa de sincitiotrofoblastos (STB) en contacto con el espacio intervelloso formada por trofoblastos sincitializados multinucleados; y ii) la capa interna de citotrofoblastos (CTB) con capacidad proliferativa (Ander *et al.*, 2019; Staun-Ram y Shalev, 2005). Estas capas recubren el estroma de las microvellosidades donde se ubican los fibroblastos, los macrófagos placentarios o HBCs y los capilares fetales (**Figura 6**) (Noronha *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2017; Tabata *et al.*, 2016). Es importante acotar que, de las microvellosidades, solo las células del STB son refractarias a la infección por diversos patógenos incluidos ZIKV, debido a la secreción de IFN III (Arora *et al.*, 2017; Bayer *et al.*, 2016; McConkey *et al.*, 2016). En la **Tabla 1**, se muestran las diferentes células que forman parte de las microvellosidades y los estudios que demuestran su susceptibilidad a infección por ZIKV.

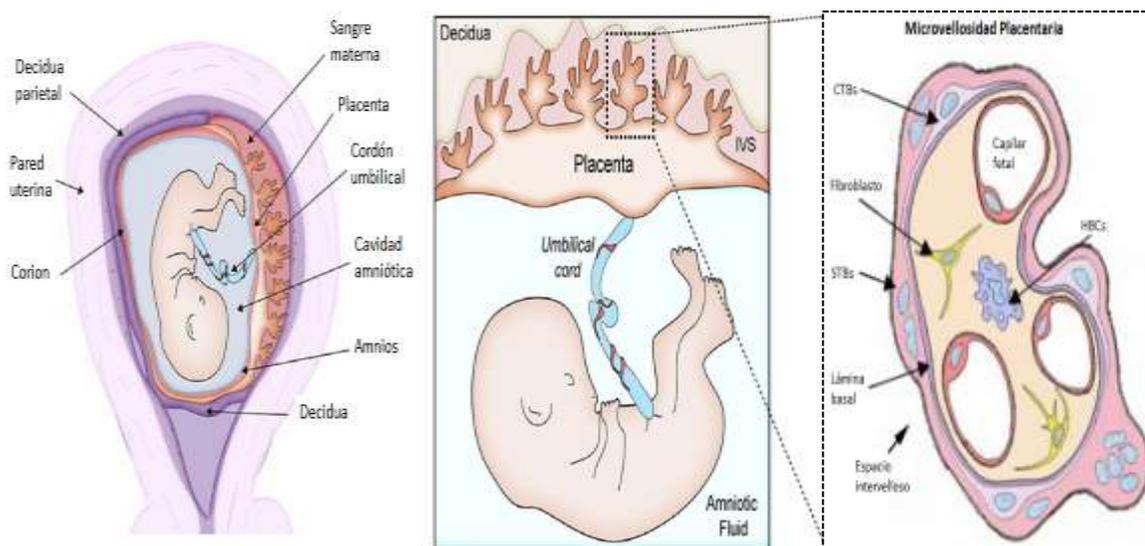


Figura 6: Estructura y composición celular de la placenta humana. Modificada de: Arora *et al.*, (2017).

Tabla 1: Células de las microvellosidades placentarias susceptibles a infección por ZIKV.

Tipo de célula	Susceptibilidad	Referencias
Sincitiotrofoblasto	No susceptible	Bayer <i>et al.</i> , (2016) Arora <i>et al.</i> , (2017)
Citotrofoblasto	Susceptible	Noronha <i>et al.</i> , (2016) Tabata <i>et al.</i> , (2016) Quicke <i>et al.</i> , (2016) Luo <i>et al.</i> , (2018) Tabata <i>et al.</i> , (2019)
Fibroblasto	Susceptible	Tabata <i>et al.</i> , (2016) Zhang <i>et al.</i> , (2019)
Célula de Hofbauer	Susceptible	Tabata <i>et al.</i> , (2016) Quicke <i>et al.</i> , (2016) Rosenberg <i>et al.</i> , (2017) Martinez & Pickett, (2018)
Endotelio capilar	Susceptible	Tabata <i>et al.</i> , (2016) Anfasa <i>et al.</i> , (2019) Zhang <i>et al.</i> , (2019) Gandolfo <i>et al.</i> , (2022)

Elaboración propia (2022)

1.2.4 Rutas usadas por ZIKV para cruzar la barrera hematoplacentaria

El ZIKV es transmitido verticalmente de madre a hijo durante el primer trimestre de gestación, aunque los mecanismos utilizados por el virus para cruzar la barrera hematoplacentaria aun son desconocidos. No obstante, con base en estudios de infección *in vitro* de células de origen placentario y de animales de experimentación se han propuesto algunos modelos de ingreso del virus al estroma de la placenta.

Tabata *et al.*, (2016; 2019), proponen que ZIKV puede cruzar la barrera hematoplacentaria durante el primer trimestre de gestación, cuando está ocurriendo el proceso de periimplantación y la remodelación de la vasculatura uterina. En ese momento, los trofoblastos invasivos son capaces de entrar en contacto directo con las células deciduales maternas infectadas con el virus, describiendo dos rutas de transmisión (**Figura 7**). Una ruta placentar dada por la interacción de los trofoblastos con células de la decidua basal infectadas, siendo estos trofoblastos los responsables de llevar el virus hasta el estroma

de la microvellosidad, infectando a otras células (fibroblastos y HBCs) y burlando la respuesta de IFN tipo III mediada por las células del STB. La otra ruta descrita es la paraplacentar donde la interacción de los trofoblastos ocurre con las células infectadas de la decidua parietal, los trofoblastos ya infectados atraviesan las membranas amniocoriónicas y liberan el virus directamente en el líquido amniótico donde el feto en formación se infecta a través de células epiteliales susceptibles.

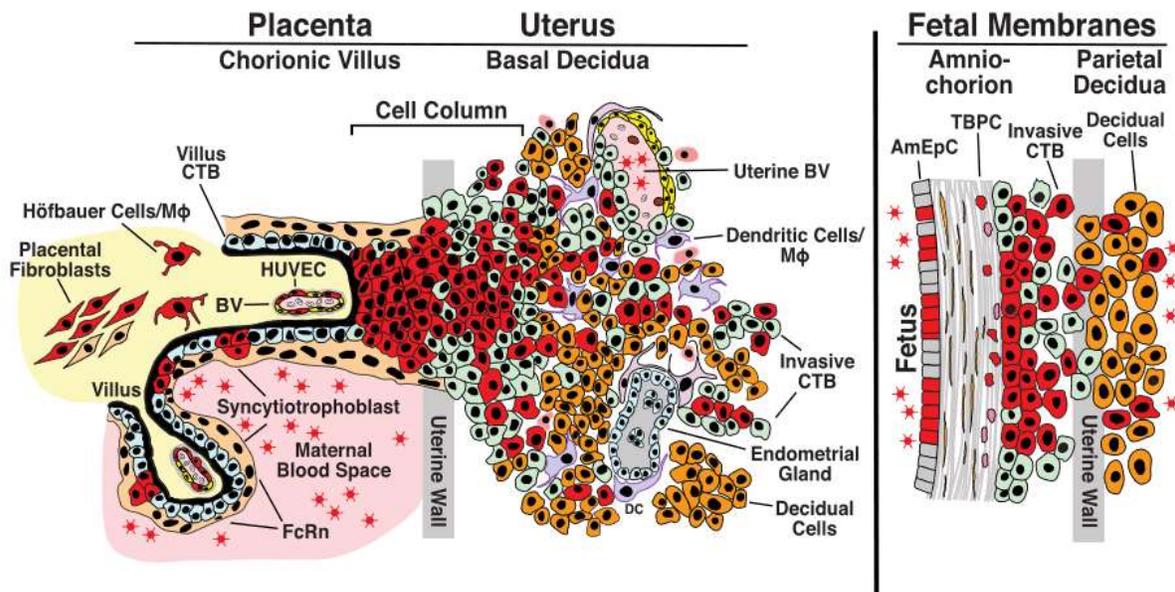


Figura 7: Transmisión vertical de ZIKV a través de deciduas maternas infectadas.
Tomada de: Tabata *et al.*, (2019).

Zimmerman *et al.*, (2018), proponen un modelo de transmisión vertical por transcitosis, mediada por anticuerpos anti-DENV presentes en mujeres gestantes que han padecido infección previa con DENV (**Figura 8**). Estos anticuerpos reconocerían a ZIKV y formarían inmunocomplejos en el espacio intervilloso, que posteriormente serían reconocidos por receptores FcRn, presentes en la membrana del STB de la microvellosidad. Esto permite que el virus burle la respuesta antiviral de IFN λ y pueda llegar a la capa del CTB, infectando a estas células y estableciéndose la infección en el estroma placentario.

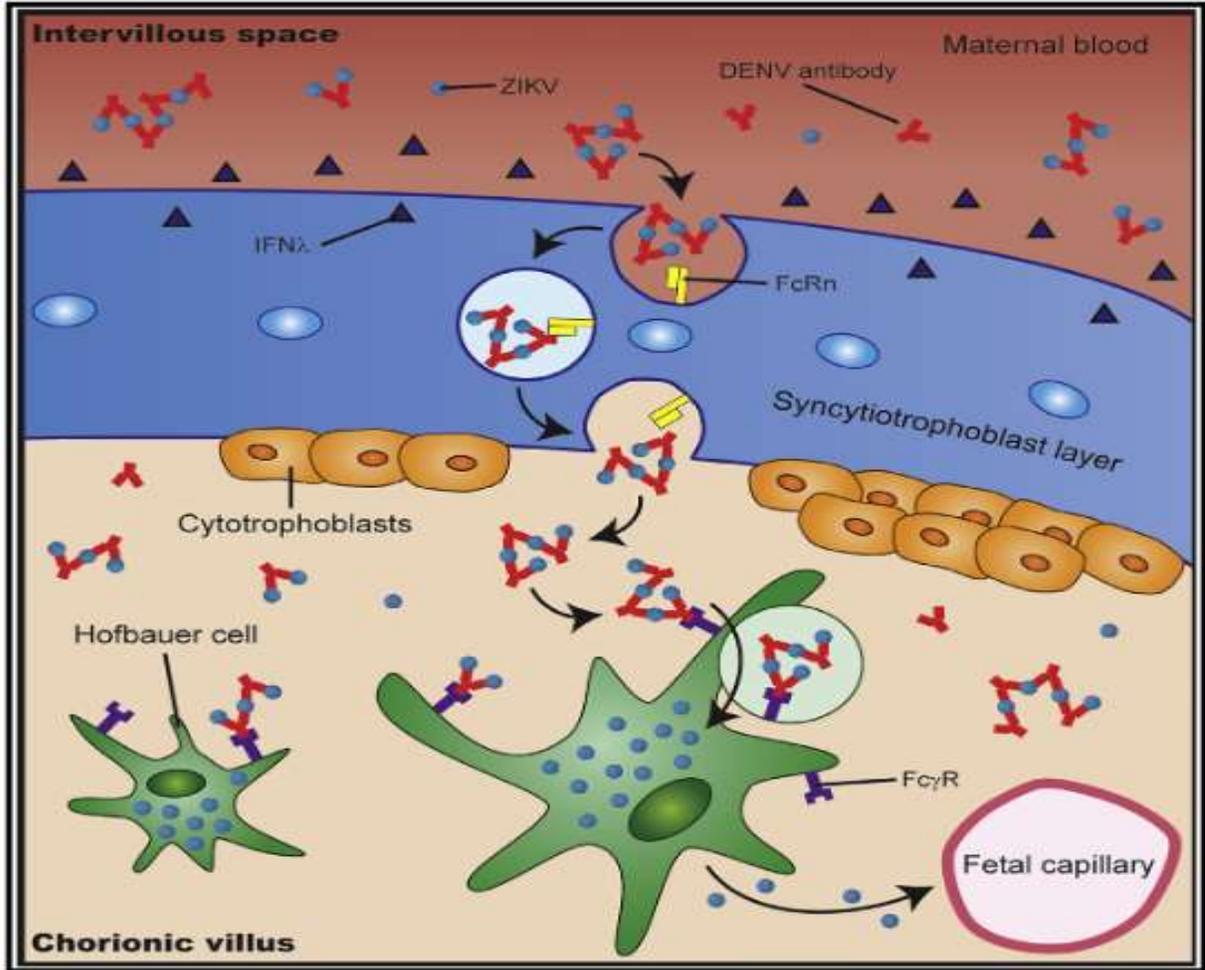


Figura 8: Transmisión vertical de ZIKV media por transcitosis con anticuerpos anti-DENV.
Tomada de: Zimmerman *et al.*, (2018).

El último modelo propuesto es la invasión a través de la ruta paracelular, basado en la observación de que la infección por ZIKV induce disminución en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas (*tight junctions*) claudina-4 (Miranda *et al.*, 2019), ZO-1 y ocludina (Chiu *et al.*, 2020) en la capa del STB, modificando su permeabilidad y favoreciendo el ingreso del virus al estroma placentario (**Figura 9**).

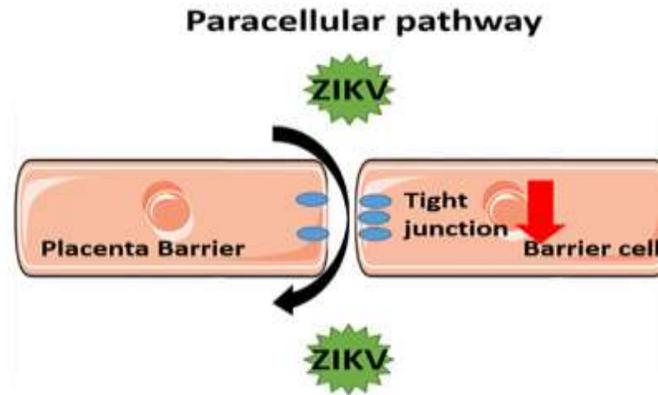


Figura 9: Modelo de transmisión vertical de ZIKV a través de la ruta paracelular.
Tomada de: Chiu *et al.*, (2020).

1.3 Blanco mecanístico de rapamicina en mamíferos (mTOR) y su modulación en la infección por flavivirus

La proteína mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) es una Ser/Thr cinasa de 289 kDa, miembro de la familia de las fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). Esta proteína cumple funciones pleiotrópicas, participando en la regulación del inicio de la transcripción del ARNm y en la síntesis de proteínas en respuesta a las concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales (Dennis *et al.*, 2001; Huang y Houghton, 2003; Laplante y Sabatini, 2009). mTOR es el componente principal de los complejos mTORC1 y mTORC2, los cuales a su vez están conformados por otras proteínas señalizadoras que participan en la modulación de sus funciones (**Tabla 2**).

La interacción del complejo mTORC1 con Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) es esencial para la fosforilación de S6r y 4E-BP1, las cuales son moléculas efectoras que regulan la biogénesis de ribosomas, traducción de proteínas, lipogénesis, crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Foster y Fingar, 2010; Laplante y Sabatini, 2009; Sarbassov *et al.*, 2005). El complejo mTORC2 interactúa con Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) y fosforila a la Ser/Thr cinasa AKT mediante PI3K, promoviendo la proliferación y supervivencia celular mediante modulación negativa de autofagia, así como también, la migración celular por regulación de la organización del citoesqueleto (Foster y Fingar, 2010; Huang *et al.*, 2011; Laplante y Sabatini, 2009; Preuss *et al.*, 2013). Finalmente, ambos complejos contienen a Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*) que actúa como un componente regulador que inactiva tanto a

mTORC1 como a mTORC2 (**Figura 10**) (Foster y Fingar, 2010; Laplante y Sabatini, 2009; Li *et al.*, 2014; Sarbassov *et al.*, 2005).

Tabla 2: Proteínas señalizadoras que regulan la activación de la maquinaria mTOR.

Proteína	Complejo	Función
mLST8/GβL Subunidad LST8 del complejo mTOR	mTORC1 mTORC2	Participa en el ensamblaje de ambos complejos por unión con el dominio mTOR. Esta interacción es crucial para la activación de mTORC2.
Deptor Proteína con dominio DEP que interactúa con mTOR	mTORC1 mTORC2	Regulación negativa de ambos complejos.
FKBP12 Peptidil – Prolil – Cis – Trans isomerasa FKBP12	mTORC1	Proteína con dominio de unión a rapamicina, el complejo inhibe alostéricamente el ensamblaje de mTORC1.
PRAS40 Sustrato de AKT rico en prolina (40kDa)	mTORC1	Inhibición sustrato competitiva de mTORC1.
Raptor Proteína asociada a la regulación de mTOR	mTORC1	Proteína de andamiaje que une la cinasa mTOR con los sustratos 4EBP1 y S6r para promover la señalización de mTORC1.
PRR5/ protor Proteína rica en prolina ligada a Rictor	mTORC2	Función desconocida.
mSIN1 Proteína de unión a cinasa activada por estrés en mamíferos	mTORC2	Promueve ensamblaje de mTORC2 y señalización mediada por fosforilación de AKT.
Rictor Compañero de mTOR insensible a rapamicina	mTORC2	Promueve ensamblaje de mTORC2 y señalización mediada por fosforilación de AKT.

Fuente: elaboración propia. Foster y Fingar, (2010); Laplante y Sabatini, (2009).

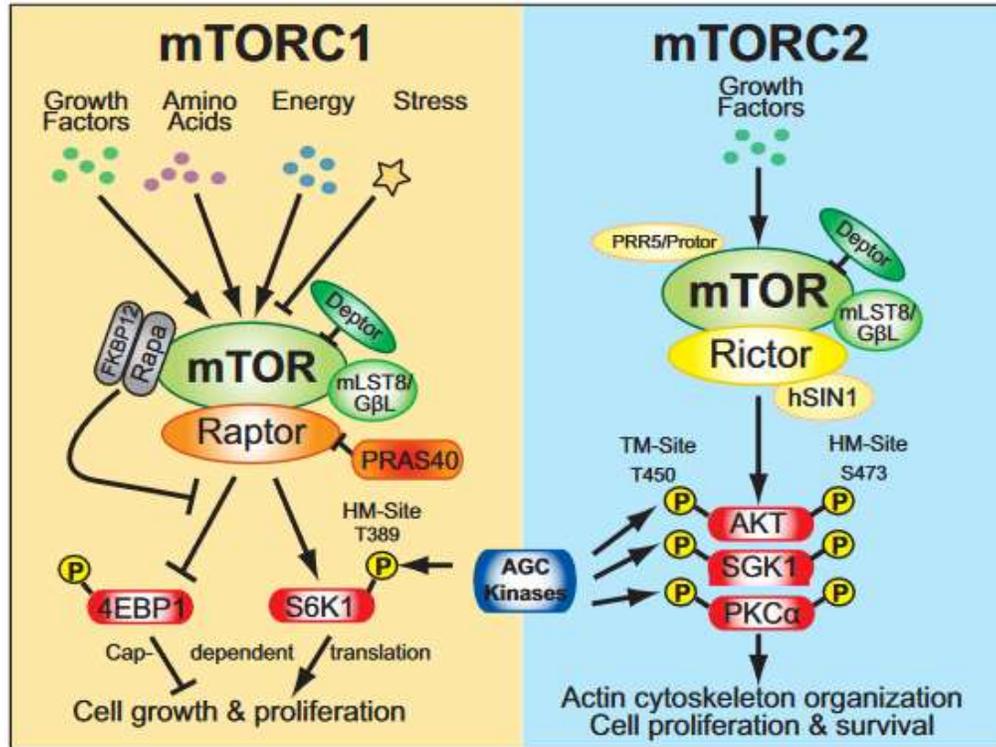


Figura 10: Esquema de señalización de mTORC1 y mTORC2 con las proteínas asociadas, sustratos y funciones de cada complejo.
 Tomada de: Foster y Fingar, (2010).

Los virus de ARN incluidos algunos flavivirus como ZIKV, DENV y YFV tienen la capacidad de modular a mTOR para favorecer su replicación viral (Albentosa-González *et al.*, 2021; Chan *et al.*, 2018; Chiramel y Best, 2018; Gratton *et al.*, 2019; Kongt *et al.*, 2020; Sahoo *et al.*, 2020; Vidotto *et al.*, 2017). La autofagia es un reconocido mecanismo de respuesta antiviral en la interfaz materno-fetal (Ngono y Shresta, 2018). No obstante, se ha descrito que en la infección por ZIKV, la autofagia controlada puede ser pro o antiviral según la etapa de ciclo de replicación y el tipo celular involucrado (Chiramel y Best, 2018). Estudios *in vitro* realizados en células de origen hepático (Albentosa-González *et al.*, 2021; Chan *et al.*, 2018) y neuronales (Chant *et al.*, 2018; Sahoo *et al.*, 2020) demuestran que la inactivación de la vía mTOR a través del uso de fármacos inhibidores o por silenciamiento de las moléculas reguladoras Raptor y Rictor afecta significativamente la replicación de ZIKV. Esto sugiere que las funciones pleiotrópicas de mTOR, tales como modulación de autofagia, activación de transcripción, síntesis de proteínas, supervivencia celular, entre otras son necesarias para favorecer la replicación de ZIKV. Asimismo, el estudio realizado por Albentosa-González *et*

al., (2020), demuestra que la vía AKT/PI3K esta involucrada en la activación de la polimerasa viral NS5 de ZIKV, necesaria para que se cumpla la replicación el genoma viral.

1.4 Inmunidad innata en la infección por ZIKV

El principal efector de la inmunidad innata en contra de las infecciones de origen viral es el sistema de interferón (IFN), el cual comprende tres tipos: tipo I (IFN- α , IFN- β), tipo II (IFN- γ) y tipo III (IFN- λ ,1-4) (Schneider *et al.*, 2014; Ngono y Shresta, 2018). La respuesta de IFN se activa a las pocas horas de la infección viral y viene dada por la interacción entre PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*) presentes en el genoma viral y los receptores PRR (*Pattern-recognition receptors*), tales como TLR y RIG-I. Este reconocimiento desencadena la activación de múltiples factores de transcripción, incluidos los factores reguladores de interferón (IRF) y NF- κ B, que cooperan en la inducción de interferones, citocinas y quimiocinas inflamatorias encargadas de orquestar la respuesta inmune innata (Schneider *et al.*, 2014; Ngono y Shresta, 2018).

Trabajos publicados en células de origen embrionario (Luo *et al.*, 2018) y neuronal (Stefanik *et al.*, 2018), han demostrado la capacidad de ZIKV de inactivar la respuesta de IFN y de inducir una pobre o limitada respuesta inflamatoria y quimiotáctica. Se han descrito posibles mecanismos por los cuales ZIKV puede evadir la respuesta de IFNs:

- Degradación proteosomal del activador STAT2 mediada por la unión con NS5, reduciendo la señalización para la producción de IFNs tipo I y III (Grant *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016).
- Disminución de la biogénesis de peroxisomas, los cuales funcionan como plataformas de señalización para la respuesta de IFNs (Dixit *et al.*, 2010; Odendall *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2019).

II. JUSTIFICACIÓN

El ZIKV es un flavivirus neurotrópico cuya complicación más grave es el SCZ, este síndrome se caracteriza por causar graves daños neurológicos, principalmente microcefalia en el feto en formación (Arora *et al.*, 2017; Coyne y Lazear, 2016; Dos Santos *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2020; Posas, 2016). Esta complicación se observa en el 30% de los neonatos de las madres que contraen la infección durante el primer trimestre de gestación y está asociada con los estratos socioeconómicos más desfavorecidos (Dos Santos *et al.*, 2019; Martinez-Viedma y Pickett, 2018; Musso *et al.*, 2019). Los mecanismos utilizados por ZKV para cruzar la barrera hematoplacentaria continúan siendo un enigma que requiere ser descifrado, en virtud del impacto social y su repercusión en la salud pública.

Hasta el presente, otros flavivirus como DENV y YFV que convergen en filogenia y epidemiología con ZIKV, no han sido catalogados con potencial teratogénico (Keller-Stanislawski *et al.*, 2014; Suzano *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2017). Por tal motivo se hace interesante evaluar las diferencias biológicas entre estos flavivirus que permiten el establecimiento de ZIKV, pero no de DENV y YFV, en el estroma de las microvellosidades placentarias. Es debido a lo anterior, que se plantea realizar un estudio comparativo de infección por ZIKV (linajes africano y asiático), DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal), en términos de eficiencia de infección, activación de la vía mTOR y perfil de citocinas secretado, en dos modelos celulares representativos de las microvellosidades placentarias (células HTR8 y monocitos U937 diferenciados a MØ-M2). Los datos obtenidos de esta investigación aportarán nuevos conocimientos que ayudarán a comprender mejor los mecanismos utilizados por ZIKV para el cruce de la barrera hematoplacentaria.

III. HIPÓTESIS

“La infección de células HTR8 como modelo de CTB y de monocitos U937 diferenciados a MØ-M2, como modelo de HBCs con ZIKV (linajes africano y asiático), DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal), difiere en eficiencia de infección, modulación de la vía mTOR y perfil de citocinas inducido”.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Comparar la infección por tres flavivirus de importancia clínica (ZIKV, DENV y YFV-17D) en dos líneas celulares (HTR8 y MØ-M2), en términos de eficiencia, modulación de la maquinaria mTOR y perfil de citocinas inducido.

4.2 Específicos

- 1) Caracterizar la eficiencia y cinética de infección por ZIKV (linajes africano y asiático), DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal) en células HTR8 y MØ-M2.
- 2) Evaluar la activación diferencial de la maquinaria mTOR en células HTR8 infectadas con los diferentes flavivirus.
- 3) Caracterizar el perfil de citocinas generado por células HTR8 y MØ-M2 infectados con los distintos flavivirus.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

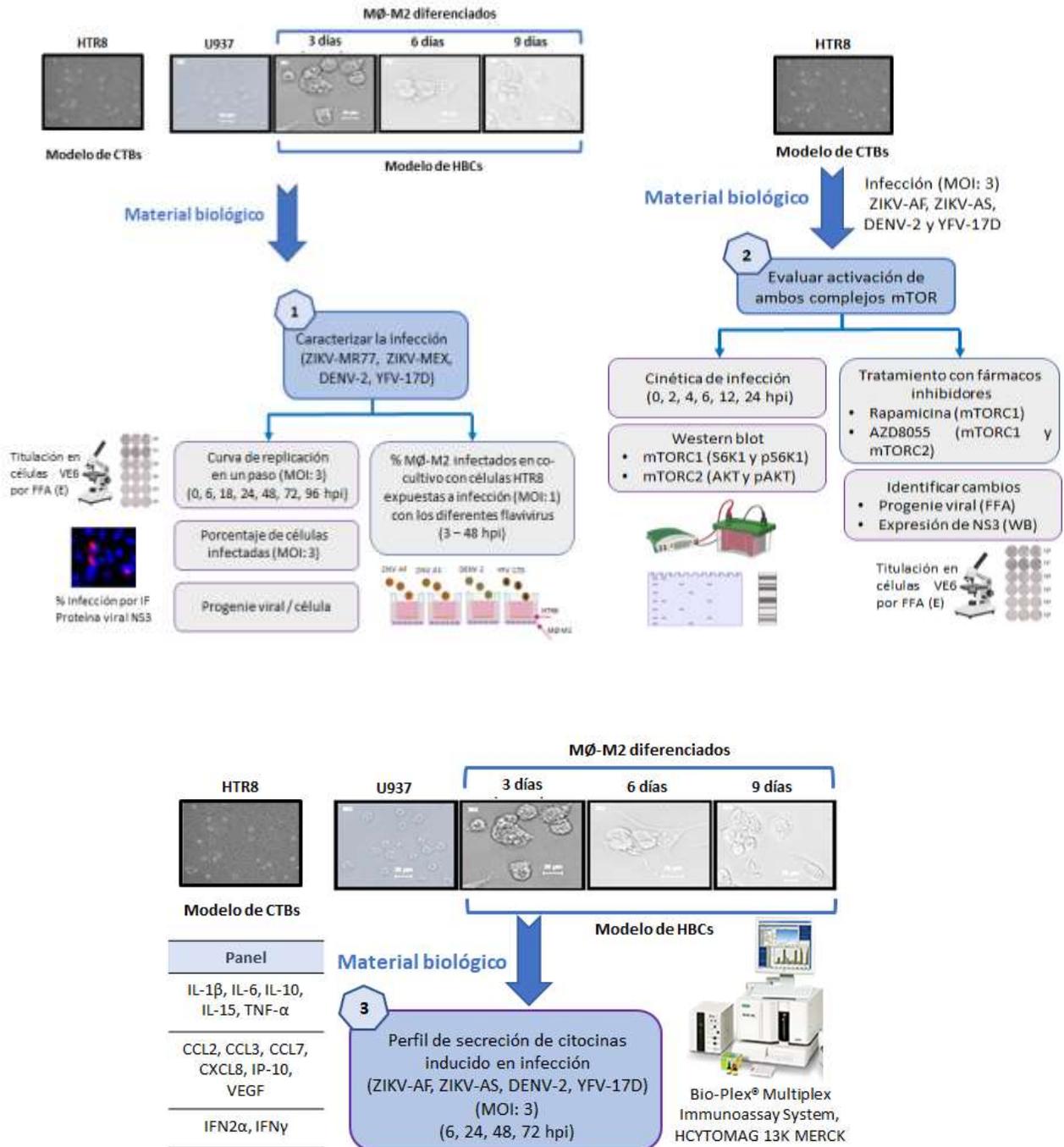


Figura 11: Diagrama resumen de la estrategia experimental.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Líneas celulares

Los ensayos de infección planteados en la estrategia experimental de esta investigación se realizaron en la línea celular HTR8-Svneo (ATCC®: CRL-3721), procedente de trofoblastos de placenta humana del primer trimestre de gestación y en células U937-DC-SIGN (ATCC®: CRL-3253) de linfoma prohistiocítico humano. Ambas líneas celulares se cultivaron a 37°C con atmósfera de CO₂ al 5 % en medio RPMI-1640 (Gibco®: 11875-093), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina. La progenie viral de los diferentes ensayos fue titulada en células epiteliales de riñón de mono verde Vero-E6 (ATCC®: CRL-1586), las cuales se cultivaron a 37°C con 5 % de CO₂, en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (ATCC®: 30-2003), suplementado con 10 % de SFB y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina. Finalmente, las células C6/36 (ATCC®: CRL-1660) de estadio larval de *Ae. albopictus*, usadas para la expansión de las cepas virales fueron cultivadas a 28°C con 5% de CO₂ en EMEM suplementado con 5 % de SFB y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina.

6.2. Cepas virales

El ZIKV linaje africano, cepa Uganda (ZIKV-MR77) fue donado por la Dra. Susana López (Instituto de Biotecnología de la UNAM. Cuernavaca, México). El ZIKV linaje asiático, aislado mexicano (ZIKV-MEX) y el DENV serotipo 2 (DENV2) cepa Nueva Guinea, fueron proporcionados por el Dr. Mauricio Vázquez, (Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos, INDRE. Ciudad de México, México). El stock de la cepa vacunal YFV-17D fue obsequiado por el Dr. Juan Salas Benito (Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN. Ciudad de México, México). Todas las cepas virales fueron propagadas en células de mosquito C6/36 y los títulos virales fueron determinados por ensayo de formación de focos en células Vero-E6.

6.3. Cultivo primario de células de Hofbauer

El aislamiento de HBCs se realizó a partir de placentas humanas procedentes del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer). Como criterio de inclusión se tomaron placentas a término (37 semanas) de mujeres saludables, mayores de 18 años y con neonatos sanos. Las placentas fueron procesadas sin identificación, previo consentimiento informado de las madres donantes (**Anexo N°3**) con el respaldo de un comité de bioética (Convenio CINVESTAV-INPer registro N° 2017-3-134) (**Anexo N°2**). Los tejidos placentarios

fueron colectados inmediatamente después de las cesáreas programadas, tomando una porción de la cara fetal de aproximadamente 25 cm².

El procesamiento de los tejidos se realizó en el Lab 3 (DIPM) CINVESTAV, siguiendo el protocolo de aislamiento de HBCs publicado por Tang *et al.*, (2011), adaptado en nuestro laboratorio por García (2018). El proceso se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Primero, se realizó el fraccionamiento mecánico del tejido hasta obtener trozos pequeños < 1 mm. Luego se procedió con la digestión enzimática utilizando tripsina-verseno al 2% (Invitros: 161004), 10 mg/mL de colagenasa II (SIGMA-Aldrich: C-6885), 10 mg/mL de colagenasa/disypasa (SIGMA-Aldrich: 11097113001) y 1 mg/mL de desoxirribunocleasa I de páncreas bovino (SIGMA-Aldrich: 9003-98-9). El tejido con la mezcla enzimática se incubó por 2 h a 37°C en agitación constante. Posteriormente, se llevó a cabo la separación subcelular por gradiente de centrifugación con Percoll (Ficoll Histopaque®-1077), centrifugando a 1800 rpm por 30 min a 4°C en un rotor basculante. Seguidamente, se extrajo la capa de células blancas y se realizó inmunoselección positiva de las HBCs con perlas magnéticas usando anti-CD14 (CD14 MicroBeads MACS humano, Miltenyi Biotec). Finalmente, las HBCs fueron incubadas en medio RPMI-1640 + 10% de SFB + 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO: 15240) a 37 °C y 5% CO₂, hasta su utilización (**Figura 12**).

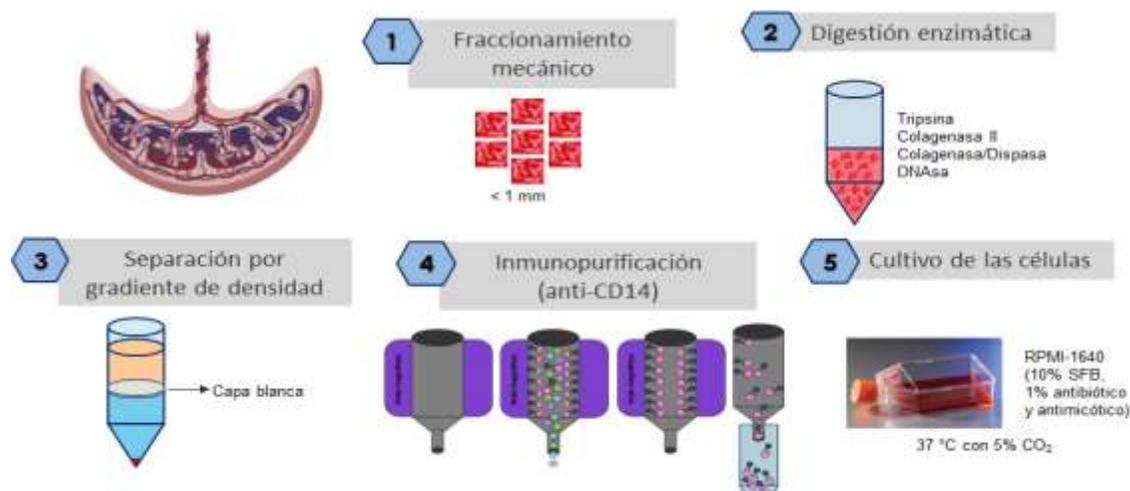


Figura 12: Esquema del protocolo de obtención de cultivo primario de HBCs.

6.4. Diferenciación de células U937-DC-SIGN a macrófagos M2 (MØ-M2)

Las células U937-DC-SIGN fueron diferenciadas a macrófagos y polarizadas a un fenotipo M2, utilizando los protocolos descritos por Puerta-Guardo *et al.*, (2010) y Ríos *et al.*, (2017), con ligeras modificaciones. Las células se trataron por 12 días con 160 nM de Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich: P1585) y 30 ng/mL de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Sigma- Aldrich: M6518), reemplazando el medio RPMI-1640 suplementado con estimuladores de diferenciación cada tercer día.

6.5. Microscopía de epifluorescencia

La confirmación del fenotipo de los MØ-M2 diferenciados se realizó primero por microscopía de epifluorescencia. Las células U937-DC-SIGN se cultivaron en placas de 24 pozos sobre cubreobjetos de vidrio y se trataron con PMA y M-CSF a las concentraciones descritas anteriormente durante 3, 6 y 9 días, incluyendo un control de células sin tratar. A los tiempos indicados, las células se fijaron con 300 μ L de paraformaldehído (PFM) al 4% por 10 min a temperatura ambiente (TA) y se lavaron dos veces con 1 mL de tampón fosfato salino 1X (PBS, *Phosphate buffered saline*). Luego, se permeabilizaron con 300 μ L de Triton X-100 al 0.1% por 10 min a TA y se repitieron los lavados antes descritos. Seguidamente, las células fueron incubadas 1 h a 37 °C con 500 μ L de solución de bloqueo (10% SFB + 25 mg/mL glicina + 2% gelatina de pescado). Posteriormente, se tiñeron con 300 μ L de un anticuerpo monoclonal (Mab) CD-163 (Abcam®: ab182422) hecho en conejo, diluido 1:300 en PBS-Tween al 0.1% + 10% de SFB y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con 1000 μ L de PBS-Tween al 0.1% y se incubaron 2 h a 37°C con 300 μ L de un anti-conejo Alexa-594 (Abcam®: ab150064) diluido 1:800 en PBS-Tween al 0.1% + 10% de SFB. Los núcleos fueron teñidos con 300 μ L de DAPI (Sigma-Aldrich®: D9542) diluido 1:1000 en PBS-Tween al 0.1%, se incubaron 5 min a TA y se repitieron los lavados con PBS-Tween al 0.1%. Finalmente, los cubreobjetos con las células tratadas o no se montaron en Fluoroshield-DAPI (Sigma-Aldrich®: F6057) y se almacenaron a 4°C hasta su visualización en el microscopio de epifluorescencia Nikon (Eclipse Ti-U).

6.6. Citometría de flujo

La confirmación del fenotipo de los MØ-M2 diferenciados también se realizó por citometría. Las células U937-DC-SIGN fueron sometidas a tratamiento con PMA y M-CSF por 0, 3, 6, 9 y 12 días siguiendo la metodología antes descrita. Las células diferenciadas y adheridas a las placas de cultivo fueron despegadas con tripsina-verseno 0.25/0.1 % (Invitros: 161004) y colectadas a los tiempos indicados. Luego, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min. El precipitado de células se fijó en suspensión con PFM al 4% durante 5 min a TA y se lavó dos veces con PBS 1X. Posteriormente, las células se bloquearon con SFB al 5 % en PBS 1X durante 10 min en hielo. Luego del respectivo lavado, las células bloqueadas se tiñeron para tres marcadores característicos de MØ-M2, usando los anticuerpos monoclonales APC anti-CD14 (Abcam®: 60901), FITC anti-CD163 (BD Bioscience®: 563697) y PE anti-DC-SIGN (Abcam®: 136333), la mezcla de anticuerpos se diluyó 1:100 en un volumen final de 50 µL. Todas las condiciones de tratamiento se incubaron en hielo durante 1 h en oscuridad y se lavaron dos veces con PBS 1X. Adicionalmente, se incluyeron los respectivos controles sin tinción para cada anticuerpo. Finalmente, las diferentes condiciones de tratamiento se analizaron en el citómetro de flujo BD-LSR II Fortessa, cuantificando 10,000 eventos en cada condición. El análisis de los resultados y los gráficos se realizaron en el software FlowJo v10.6.1. El ensayo de citometría de flujo también se utilizó para detectar la presencia del receptor DC-SIGN en la superficie de células HTR8, siguiendo la metodología anterior y usando como control positivo MØ-M2 con 12 días de diferenciación. Los análisis de citometría se realizaron con el apoyo de la Dra. Patricia Talamás y la M en C. María Elena Sánchez (DIPM, CINVESTAV).

6.7. Curvas de replicación en un paso

Células HTR8 y MØ-M2 de 12 días de diferenciación fueron sembrados en placas de 96 pozos. Las monocapas confluentes de cada tipo celular se infectaron por triplicado con las cepas de ZIKV-MR77, ZIKV-MEX, DENV-2 y YFV-17D usando una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Para sincronizar las infecciones, la adhesión viral se llevó a cabo durante 40 min a 4°C. Posteriormente, se procedió a retirar el inóculo viral, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y se les agregó 200 µL de medio RPMI-1640 + SFB al 10%. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y se dejó proseguir la infección durante 0, 6, 18, 24, 48, 72 y 96 h. Los sobrenadantes fueron colectados a las horas post-infección (hpi) indicadas y almacenados a -80°C, para su posterior titulación por ensayo de focos en células Vero-E6 (VE6).

6.8. Titulación viral por ensayo de foco

La titulación de los sobrenadantes condicionados de las curvas de replicación se realizó por ensayo de formación de focos, con ligeras modificaciones al protocolo descrito por Payne *et al.*, (2006). Monocapas de células VE6 sembradas en placas de 96 pozos se infectaron con 50 μ L de diluciones seriadas 1:10 de los sobrenadantes y se incubaron por 2 h a 37°C. Seguidamente, cada pozo fue completado con 150 μ L de medio EMEM + SFB 10% y se incubó la infección por 48 h. Transcurrido el tiempo post-infección, las células se fijaron con 100 μ L de PFM al 4% durante 10 min a TA y se lavaron 2 veces con 200 μ L de PBS 1X. Luego, las células fueron permeabilizadas con 100 μ L de metanol frío por 10 min a TA y se hicieron los respectivos lavados. A continuación, las células se tiñeron con 50 μ L de anti-E Mab (4G2) hecho en ratón (obsequio del Dr. Ferdinando Liprandi, IVIC. Caracas, Venezuela), diluido 1:2,500 con PBS-Tween 0.1% + SFB 10% y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces con 200 μ L de PBS-Tween 0.1% y marcadas con 50 μ L de un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immuno-Research®: 15-035-003) diluido 1:5,000. Se incubaron 2 h a 37°C y se hicieron los respectivos lavados con PBS-Tw 0.1%. La actividad peroxidasa del anticuerpo secundario se reveló utilizando como sustrato el kit DAB (Vector-Laboratories®: SK-4100), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los focos de infección se cuantificaron por visualización en un microscopio invertido y los títulos virales se expresaron como UFF/mL.

6.9. Cuantificación de porcentaje de células infectadas

Las monocapas de células HTR8 y M2-MØ de las curvas de replicación de un paso se utilizaron para determinar el porcentaje de células infectadas a las 24, 48, 72 y 96 hpi, a través de inmunofluorescencia (IF). Siguiendo la metodología de IF antes descrita, ambas líneas celulares fueron marcadas con un Mab anti-NS3 (1ED8) hecho en ratón (obsequio de la Dra. Eva Harris, UC Berkeley) de reactividad cruzada con varios flavivirus. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-ratón Alexa-488 (Abcam®: ab150064) y los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI. Las células se analizaron y cuantificaron en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon (Eclipse Ti-U). Los resultados se expresaron en porcentajes de células infectadas tomando como 100% el número total de núcleos marcados con DAPI por campo. Finalmente, se calculó el rendimiento de virus por célula a partir de la relación entre la

progenie viral y el porcentaje de células infectadas en cada condición, asumiendo una confluencia de 10×10^5 células por pozo.

6.10. Caracterización de la polaridad de células HTR8

Para determinar la presencia o ausencia de polaridad en las células HTR8, éstas se cultivaron sobre laminillas cubre objeto en placas de 24 pozos hasta observar la máxima confluencia de la monocapa celular. Posteriormente, se realizó la tinción vital con 1 gota (50 μ L) de BODI-PY FL-C12-esfingomielina (Invitrogen: D7711) y las laminillas portaobjetos se prepararon con líquido de montaje Fluoroshield-DAPI para su visualización y análisis en el microscopio confocal Zeiss LSM700. Adicionalmente, se realizó IF para determinar la expresión de las proteínas de unión estrecha ZO-1 y ocludina. Laminillas de monocapas confluentes de células HTR8, se tiñeron con anti-ZO-1 de conejo (Invitrogen: 402200) diluido 1:100 y anti-Occ de ratón (Invitrogen: 331500) diluidos 1:50. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-conejo IgG 488 (Invitrogen: A11006) y anti-ratón IgG 647 (Invitrogen: A21235) ambos diluidos 1:100 y los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI. Las tinciones y la observación por microscopía confocal se realizaron con el apoyo de la Dra. Abigail Betanzos y la M en C. Angélica Silva-Olivares (DIPM-CINVESTAV).

6.11. Cinética de infección en sistema de cultivos Transwells®

En un sistema de platos Transwells® (Corning: 3460) con placa de 12 pozos y filtro con poro de 0.4 μ m, se sembraron MØ-M2 de 12 días de diferenciación en el fondo de la placa y en el filtro monocapas confluentes de células HTR8 (Figura 13). Estas células fueron previamente infectadas con ZIKV-MR77, ZIKV-MEX, DENV-2 y YFV-17D a MOI:1. La infección se sincronizó por 1 h a 4°C, luego se incubó por 2 ha 37°C mientras ocurría el proceso de entrada viral. Seguidamente, se retiró el inóculo viral, se lavaron las células, se colocaron los filtros sobre el plato con los MØ-M2 sembrados en el fondo y se dejó transcurrir la infección a varios tiempos (3, 6, 9, 12, 24 y 48 hpi). Posteriormente, se midió la velocidad de infección de los MØ-M2 en co-cultivo con células HTR8 infectadas, por IF utilizando la proteína NS3 como marcador de infección. La visualización y cuantificación de los MØ-M2 infectados se realizó en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon (Eclipse Ti-U), siguiendo la metodología empleada en la cuantificación del porcentaje de células infectadas.

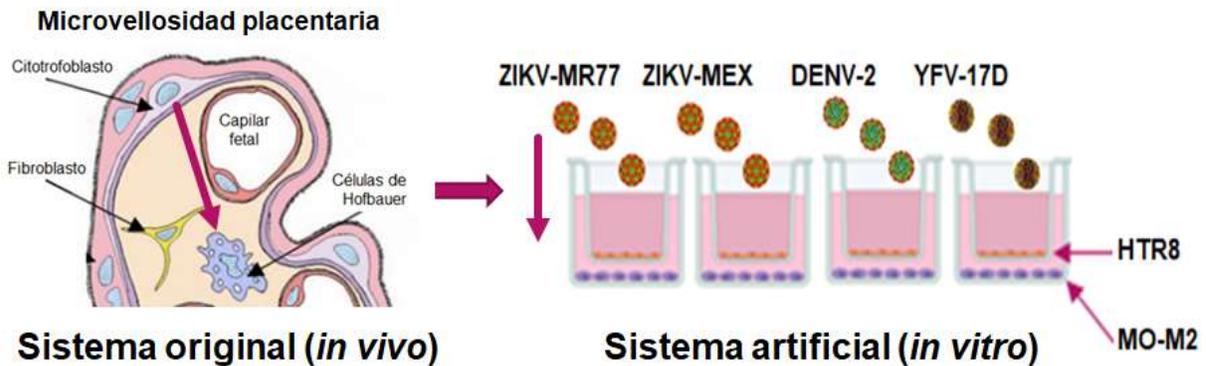


Figura 13: Esquema de infección en sistema de cultivos Transwells®.

6.12. Ensayo de Western blot para medir la activación de mTOR en células HTR8

Monocapas de células HTR8 sembradas en placas de 24 pozos, fueron infectadas con los flavivirus evaluados a una MOI: 3, las infecciones fueron seguidas a diversos tiempos (0, 2, 4, 6, 12 y 24 hpi) y se incluyeron condiciones MOCK como control negativo de infección. La activación de las vías mTORC1 y mTORC2 se evaluó por ensayo de Western blot; para ello, las células fueron lisadas a los tiempos indicados con 200 μ L de tampón de lisis RIPA (NaCl 5 M, EDTA 0.5 M pH 8, desoxicolato de sodio al 10 %, SDS al 10 %, Tritón X-100 al 10 %) complementado con inhibidores de proteasas (Sigma- Aldrich®: P8340). La concentración de los extractos proteicos se cuantificó con el reactivo de Bradford (BioRad®: 500-0006) y las absorbancias se leyeron por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm. Se mezclaron 15 μ g de proteína con tampón de carga Laemmli 4X en un volumen final de 20 μ L y se sometieron a ebullición por 5 min. Los extractos proteicos fueron migrados electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% por 2 h a un voltaje entre 80 y 120 V.

Las proteínas fueron transferidas en húmedo de los geles a las membranas de nitrocelulosa (BioRad®: 0,45 μ m) siguiendo los protocolos estándar. Seguidamente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS-Tw 0.1% por 40 min a TA. Se retiró la solución de bloqueo y las membranas se dejaron incubando toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios, hechos en conejo (donados por el Dr. Porfirio Nava, DBFN-CINVESTAV); Mab anti-S6-ribosomal (Cell Signaling®: 2217) y Mab anti-Phospho-S6-ribosomal (Cell Signaling®: 4858), para la vía mTORC1; y Mab anti-AKT1 (Cell Signaling®:

2938) y anti-Phospho-AKT (Ser473) (Cell Signaling®: 4060), para la vía mTORC2. Finalmente, se procedió a incubar las membranas con un anti-HRP de conejo (GeneTex®: GTX-26821) como anticuerpo secundario. Todos los anticuerpos se diluyeron en leche descremada al 5 % con PBS-Tw al 0.1 %. La señal de HRP se detectó con el kit SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific: 34096). Las fracciones de proteínas fosforiladas se normalizaron con las fracciones no fosforiladas correspondiente a cada muestra. Las imágenes digitales fueron capturadas con el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) y analizadas con el software ImageJ29 (Rasband, 1997).

6.13. Tratamiento con inhibidores de mTOR y viabilidad celular

Para la inhibición farmacológica de la maquinaria mTOR, se utilizaron dos inhibidores alostéricos de la actividad cinasa mediada por esta vía. Rapamicina (Tocris-Bioscience®: 53123-88-9) inhibidor del complejo mTORC1 y AZD8055 (AstraZeneca®: 2525) inhibidor de ambos complejos (donados por el Dr. Porfirio Nava, DBFN – CINVESTAV). Los fármacos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®: D-2650) antes de ser utilizados. Posteriormente, monocapas confluentes de células HTR8 en placas de 96 pozos fueron tratadas con diferentes concentraciones de cada fármaco, partiendo de las concentraciones (IC: 50) sugeridas por los fabricantes. Para Rapamicina, las concentraciones probadas fueron (100, 10, 1 y 0.1 nM) y para AZD8055 fueron (10000, 1000, 100 y 10 nM). Se probaron triplicados biológicos de cada condición de tratamiento, incluidos los controles sin tratamiento y DMSO. Transcurridas las 48 h postratamiento, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de proliferación celular no radiactiva Cell Titer 96 Aqueous (ensayo MTS) (Promega®: G3580). El cual consistió en incubar las células tratadas con 50 µl de EMEM + 10 µl del reactivo de MTS por 30 min a 37 °C, la variación de color se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490 nm. Los valores de viabilidad fueron expresados como porcentaje, tomando como 100 % la condición control, sin tratamiento.

6.14. Efecto de la inhibición de mTOR en la progenie viral en células HTR8

Luego de determinar las concentraciones máximas no letales tanto de Rapamicina como de AZD8055, se trataron monocapas de células HTR8 sembradas en placas de 24 pozos durante 24 h. Posteriormente, fueron infectadas con las diferentes cepas virales a MOI:3 y a las 24 hpi se colectaron los sobrenadantes de cada condición y se determinó la progenie viral por ensayo de formación de focos en células VE6. Adicionalmente, se obtuvieron lisados proteicos para

medir por WB la expresión de la proteína viral NS3, utilizando el Mab 1ED8 anti-NS3 y anti- β -tubulina (GeneTex®: GTX-101279) como control de carga. Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anti-HRP de ratón (Jackson Immuno-Research®: 15-035-003) y anti-HRP de conejo. Cultivos de células HTR8 infectadas y no tratadas fueron incluidas como control en este ensayo.

6.15. Perfil de citocinas inducido en células HTR8 y MØ-M2 infectados

Monocapas de células HTR8 y MØ-M2 de 12 días de diferenciación, sembrados en placas de 6 pozos se infectaron con las cepas virales evaluadas a MOI: 3, incluyendo condiciones MOCK como control negativo de infección. Cada experimento de infección se realizó por triplicado y los sobrenadantes condicionados se colectaron a las 6, 24, 48 y 72 hpi. Posteriormente, cada sobrenadante se analizó por triplicado para determinar la presencia de las siguientes citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-15, TNF α , MCP-1/CCL-2, MIP-1 α /CCL-3, MCP3/CCL-7, IP-10/CXCL10, VEGF, IFN-2 α e IFN- γ . La medición se realizó con el kit comercial Bio-Plex® Multiplex Immunoassay System (HCYTOMAG 13K MERCK), basado en la metodología de perlas fluorescentes específicas para cada citocina. El procesamiento de los sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante y la cuantificación de las citocinas expresadas en pg/mL se determinó en el equipo Luminex X-200. Los resultados se plasmaron de manera independiente para cada citocina como gráficos de líneas utilizando el software GraphPad Prism, versión 6.01. El procesamiento de los sobrenadantes condicionados se realizó en el INPer con el apoyo de la Dra. Aurora Espejel-Núñez y la Dra. Guadalupe Estrada-Gutiérrez.

6.16. Análisis estadístico

Los valores obtenidos de todos los experimentos se expresaron como medias \pm errores estándar (*One-way* ANOVA) de al menos tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism, versión 6.01.

VII. RESULTADOS

7.1. Cultivo primario de células de Hofbauer

Los macrófagos placentarios (HBCs) son células residentes del estroma de las microvellosidades, susceptibles a infección con ZIKV (Martinez y Pickett, 2018; Tabata *et al.*, 2016; Quicke *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2017). Inicialmente en este trabajo de investigación se planteó establecer un cultivo primario de HBCs a partir de placentas humanas a término, para realizar los ensayos de infección con los diferentes flavivirus. Se procesaron en total 10 placentas, se aislaron y analizaron los cultivos sugestivos de HBCs por microscopía de contraste de fases a las 24 h posteriores a su siembra. El cultivo mostró la presencia de células adherentes con características morfológicas compatibles con HBCs (**Figura 14**). Sin embargo, el rendimiento obtenido en cada placenta procesada fue muy bajo ($< 2 \times 10^6$ células/placenta). Debido a ello no fue posible establecer un cultivo primario de HBCs eficiente y reproducible que permitiera realizar los ensayos planteados. Se decidió reemplazar el cultivo primario de HBCs por dos líneas celulares, prohistiocitos U937-DC-SING diferenciados y polarizadas a MØ-M2 como un modelo de HBCs y células trofoblásticas HTR8 representativas de CTB.

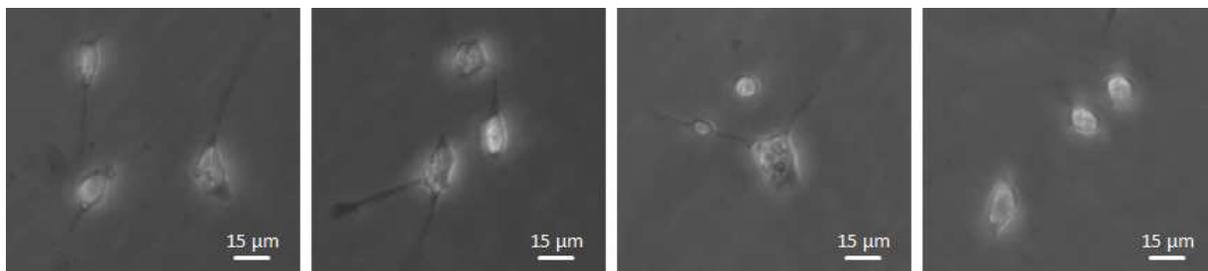


Figura 14: Células de Hofbauer (HBCs) aisladas de placentas humanas a término.

Células en cultivo a las 24 horas posterior a su aislamiento visualizadas por microscopía de contraste de fase con objetivo de 20X tomadas con microscopio invertido.

7.2. Caracterización de macrófagos M2 y células HTR8

Las células de Hofbauer son macrófagos placentarios residentes en el núcleo de las microvellosidades. Estas células exhiben un fenotipo principalmente M2, caracterizado por la expresión de marcadores de superficie como DC-SIGN, CD163 y CD14, entre otros (Yao *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2021). En este estudio se trataron células U937-DC-SIGN con PMA (160 nM) y M-CSF (30 ng/mL) durante 12 días para diferenciarlas a MØ-M2. El fenotipo de las células tratadas se determinó por microscopía de epifluorescencia, utilizando la expresión de CD163 a los 3, 6 y 9 días de tratamiento. Las imágenes de epifluorescencia muestran células de

aproximadamente 20 μm , adherentes y pleomórficas con citoplasma granular y vacuolado, positivas para expresión de CD163 a partir del tercer día de tratamiento (**Figura 15**).

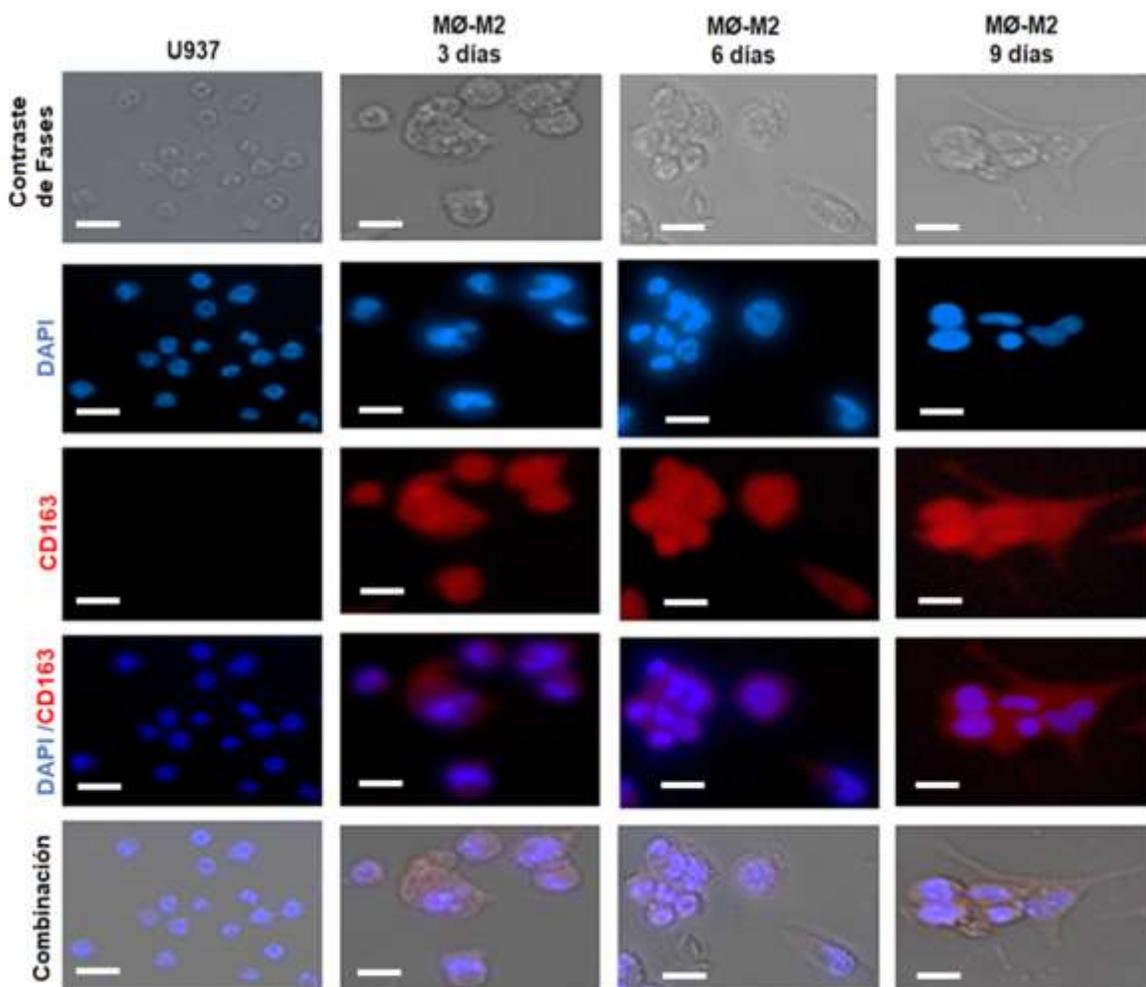


Figura 15: Diferenciación de células U937-DC-SIGN a MØ-M2.

Células U937 fueron sembradas en placas de 24 pozos y sometidas a tratamiento con PMA (160 nmol/L) y M-CSF (30 ng/mL). Se comprobó adherencia, cambio de morfología y expresión de CD163 (rojo) por IF a los 0, 3, 6 y 9 días postratamiento, en microscopio invertido de epifluorescencia con objetivo de 30X (escala 20 μm). Los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI (azul).

Por citometría de flujo se evaluó el tamaño, la granularidad citoplasmática y la expresión de los receptores (DC-SIGN, CD14, CD163) a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de tratamiento. El análisis de Side Scatter (SSC-A) versus Foward Scatter (FSC-A) indicó que las células de 6 y 9 días de tratamiento experimentaron un aumento de la granularidad citoplasmática y del tamaño celular en función de los días postratamiento, estas características morfológicas son compatibles con células macrofágicas (**Figura 16**).

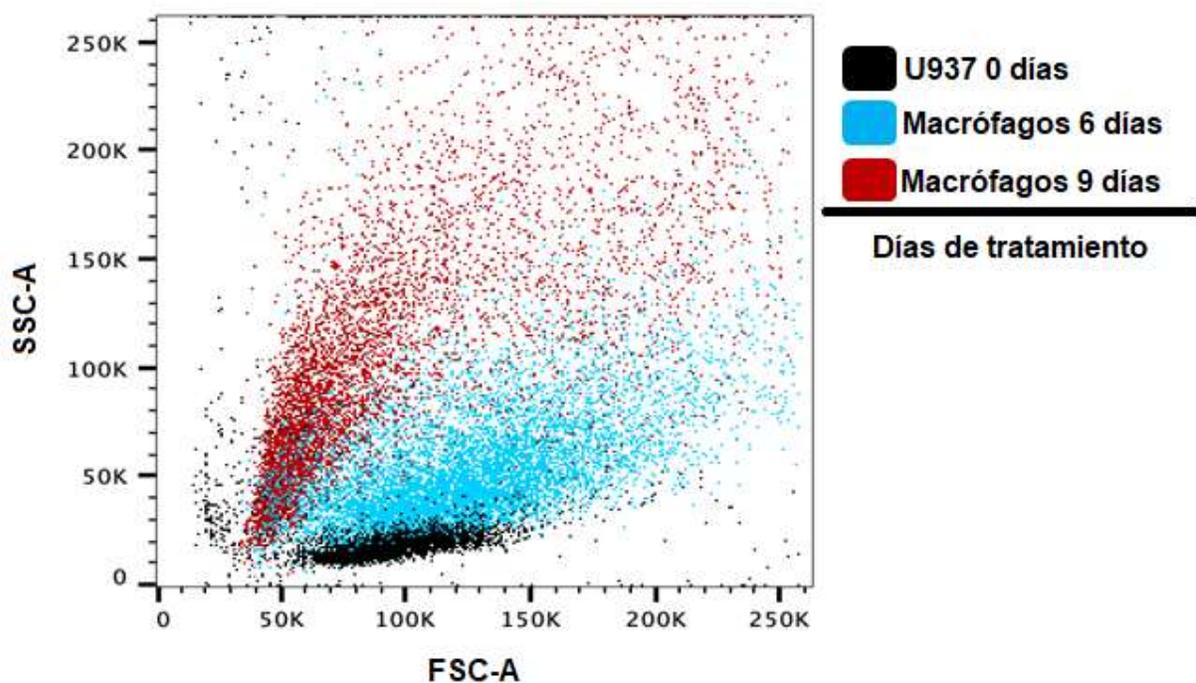


Figura 16: Dot plot de SSC-A /FSC-A de células U937 tratadas con PMA y M-CSF.

Células U937 a los 0, 6 y 9 días de tratamiento fueron fijadas y preparadas para citometría de flujo, se analizó el cambio de SSC-A (complejidad citoplasmática) / FSC-A (tamaño) con una adquisición > 10,000 eventos.

La expresión de los receptores CD14 y CD163 se analizó a partir de las células DC-SIGN positivas, observando un incremento en la expresión directamente proporcional al tiempo de tratamiento con PMA y M-CSF. El 95% de las células con 12 días de diferenciación son positivas a CD14 y CD163 (**Figura 17 A, B**). Estos resultados confirman que el tratamiento de las células U937 durante 12 días induce la diferenciación a MØ-M2 compatible con un fenotipo HBCs-like. También, se evaluó por citometría de flujo la presencia de los receptores antes mencionados en la superficie de células HTR8, los resultados demostraron la ausencia de estos receptores en la superficie celular (**Figura 17C**).

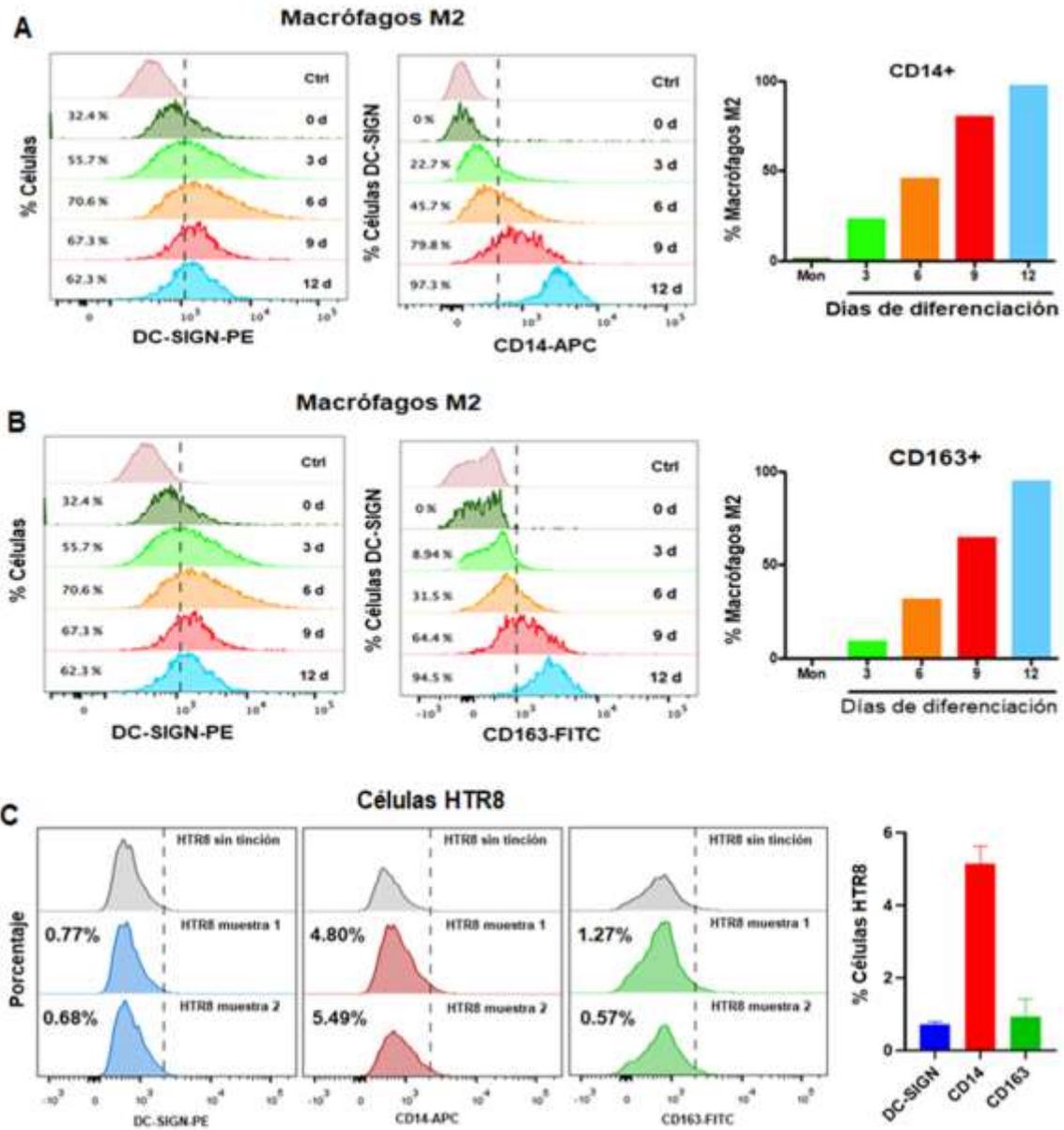


Figura 17: Expresión de los receptores DC-SIGN, CD14 y CD163 en células U937 diferenciadas a MØ-M2 y células HTR8.

A. Expresión de CD14 en células U937-DC-SIGN positivas a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de diferenciación. B. Expresión de CD163 en células U937-DC-SIGN positivas a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de diferenciación. C. Expresión de DC-SIGN, CD14 y CD163 en células HTR8. Todos los análisis se realizaron con una adquisición > 10,000 eventos.

7.3. Cinéticas de infección viral en células HTR8 y macrófagos M2

Con el objeto de identificar los factores exclusivos de las cepas de ZIKV que determinan su capacidad de atravesar la barrera hematoplacentaria, se evaluó la eficiencia de infección y replicación de dos cepas de ZIKV (linajes africano y asiático) en comparación con las cepas DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal), empleando 2 líneas celulares. Las curvas de replicación en un paso mostraron que las células HTR8 son susceptibles a la infección por las cuatro cepas virales evaluadas. Se evidenció una velocidad de formación de progenie viral similar en los cuatro flavivirus, con producción de partículas virales infectivas después de las 6 hpi, y alcanzando el pico máximo a las 48 hpi. Ambos linajes de ZIKV mostraron mayor eficiencia de replicación con títulos de 10^7 y 10^6 para ZIKV-MR77 y ZIKV-MEX, respectivamente, en comparación con las cepas DENV-2 y YFV-17D, que alcanzaron títulos de 10^5 (**Figura 18A**). Las células macrofágicas mostraron ser altamente susceptibles a las cuatro cepas virales, con producción de partículas virales infectivas a partir de las 6 hpi. Tal como se observó en células HTR8 el linaje africano de ZIKV muestra una mayor eficiencia de replicación con títulos de 10^9 , el resto de las cepas virales presentan diferencias de rendimiento menos marcadas (< 1 log) (**Figura 18B**).

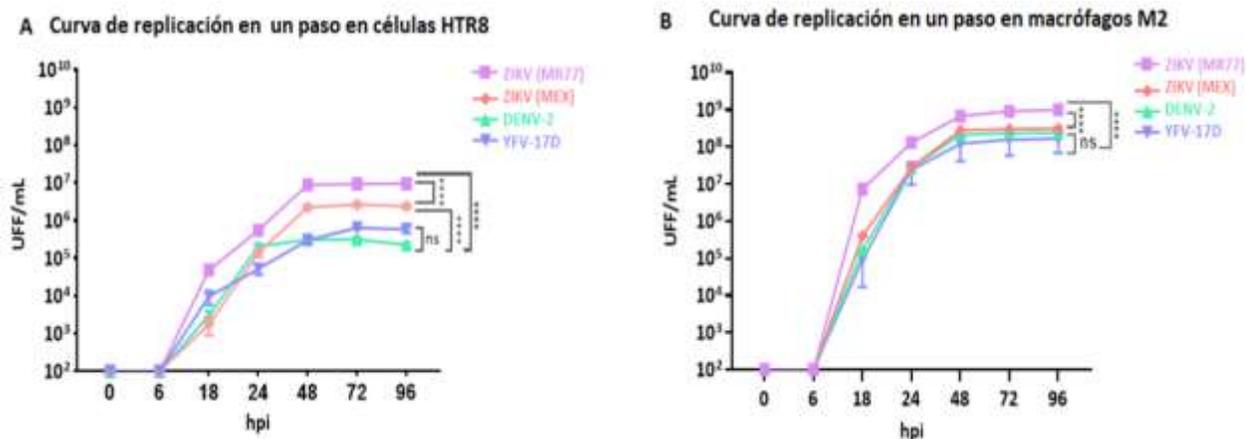


Figura 18: Cinética de replicación viral en células HTR8 y MØ-M2 infectados.

A. Curvas de replicación de un paso en células HTR8 y B en células U937 diferenciadas a MØ-M2. Las células fueron infectadas con (MOI=3) y se sincronizó la infección por incubación de las monocapas en hielo. Los sobrenadantes se titularon en células Vero-E6 por ensayos de unidades formadoras de focos. El análisis estadístico de los títulos se realizó a partir de las medias \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (**** $p \leq 0.0001$; ns, no significativo).

7.4. Porcentajes de infección en células HTR8 y macrófagos M2

Para evaluar la eficiencia de infección y confirmar los resultados obtenidos en las cinéticas de replicación viral, se determinó el porcentaje de células infectadas a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 hpi) en ambos tipos celulares. En la **Figura 19A**, se observa que el porcentaje de células HTR8 infectadas por los cuatro flavivirus es relativamente bajo. A pesar de esto, se logra evidenciar que ambos linajes de ZIKV presentan una mayor eficiencia de infección con un 25% de células infectadas a las 72 hpi. Este porcentaje es estadísticamente significativo en comparación a los porcentajes de infección observados con DENV-2 (15%) y YFV-17D (17%). En relación con los porcentajes de MØ-M2 infectados, los resultados indican que estas células son altamente permisivas a la infección por los flavivirus evaluados, observándose a las 24 hpi un porcentaje de infección >92% en todos los casos (**Figura 19B**).

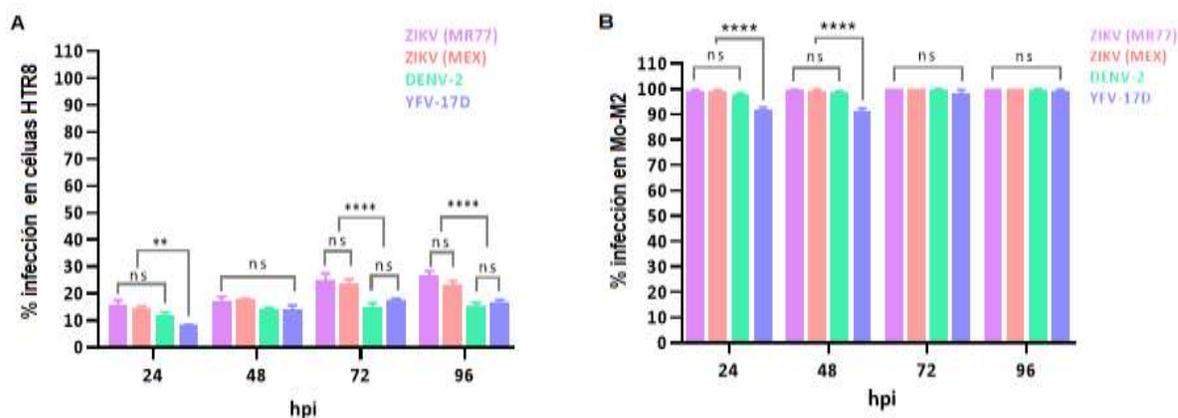


Figura 19: Porcentajes de infección en células HTR8 y MØ-M2.

A. Porcentaje de células HTR8 infectadas. B. Porcentaje de macrófagos M2 infectados. Las células infectadas con los diferentes flavivirus (MOI= 3) se tiñeron usando un Mab anti-NS3 de reactividad cruzada y los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas en relación con el número total de células teñidas con DAPI. El análisis estadístico se realizó a partir de las medias \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes (**** $p \leq 0.0001$; ** $p \leq 0.0090$; ns, no significativo).

7.5. Progenie viral en células HTR8 y macrófagos M2

Con los datos obtenidos de las cinéticas de replicación viral y los porcentajes de infección, se calculó el rendimiento de virus por célula infectada (*virus yield/cell*). En las células HTR8 se observó que la producción de partículas virales infecciosas es mayor para ambas cepas de ZIKV que para DENV-2 o YFV-17D. ZIKV-MRR77 a las 48 hpi produce 275 partículas virales por célula, siendo este valor 4 veces mayor que el número de viriones producidos por células infectadas con ZIKV-MEX y aproximadamente 20 veces más que los viriones producidos por células infectadas con DENV-2 e YFV-17D (**Tabla 3**). En cuanto al rendimiento

de virus por célula macrofágica infectada, se observa que desde las 24 hpi el linaje de ZIKV-MR77 genera mayor cantidad de viriones infectivos alcanzando un aproximado de 653 viriones por célula, rendimiento 5 veces superior al observado con los otros 3 virus (**Tabla 3**).

Tabla 3: Rendimiento de virus por célula infectada (HTR8 y M2-MØ).

Células HTR8						
Virus	Tiempo (hpi)	PVI/Cel	Cambio versus (fold)			
			ZIKV-MR77	ZIKV-MEX	DENV-2	YFV-17D
ZIKV-MR77	24	18	1	3.6	2	6
	48	275	1	4.4	22	19.6
	72	194	1	3.4	17.6	10.8
	96	196	1	3.7	28	11.5
ZIKV-MEX	24	5		1	0.5	1.7
	48	63		1	5.3	4.5
	72	57		1	5.2	3.2
	96	53		1	7.6	3.1
DENV-2	24	9			1	3
	48	12			1	0.9
	72	11			1	0.6
	96	7			1	0.4
YFV-17D	24	3				1
	48	14				1
	72	18				1
	96	17				1
MØ-M2						
Virus	Tiempo (hpi)	PVI/Cel	Cambio versus (fold)			
			ZIKV-MR77	ZIKV-MEX	DENV-2	YFV-17D
ZIKV-MR77	24	653	1	4.6	4.6	4.9
	28	3382	1	2.7	3.2	4.4
	72	4527	1	3.0	3.9	5.4
	96	4933	1	3.2	4.1	5.7
ZIKV-MEX	24	141		1	1	1.1
	48	1253		1	1.2	1.6
	72	1510		1	1.3	1.8
	96	1543		1	1.3	1.8
DENV-2	24	143			1	1.1
	48	1055			1	1.4
	72	1162			1	1.4
	96	1215			1	1.4
YFV-17D	24	134				1
	48	766				1
	72	846				1
	96	866				1

PVI/Cel: Partículas virales infectivas/ células.

7.6. Cinética de infección viral en un sistema de co-cultivo de células HTR8 y MØ-M2

Con el objetivo de simular la arquitectura de la placenta, en este trabajo se planteó realizar los ensayos de infección con los diferentes flavivirus en un sistema de platos Transwells®. Para ello, se determinó la polaridad de monocapas confluentes de células HTR8 con el colorante vital BODI-PY FL-C12-esfingomielina, utilizando como control positivo células Caco-2, las cuales por su naturaleza epitelial poseen polaridad apical. Los resultados indican que las células HTR8 en concordancia con su naturaleza fibroblástica y no epitelial, carecen de polaridad, ya que como se observa en la **Figura 20**, el colorante difunde libremente a través de la unión paracelular.

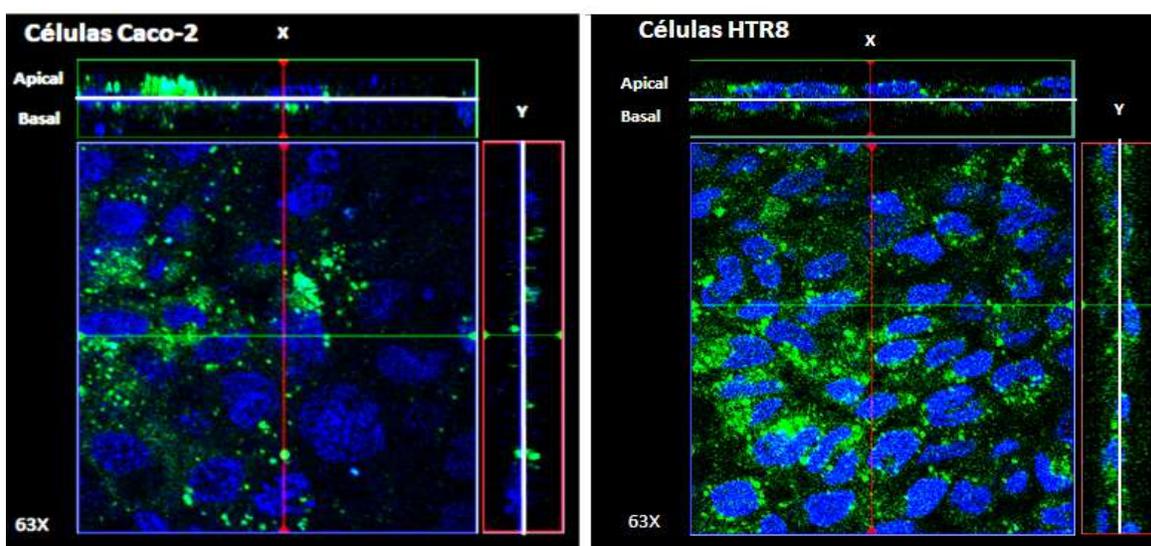


Figura 20: Tinción de células Caco-2 y HTR8 con BODI-PY.

Monocapas de células fueron teñidas con el colorante vital BODI-PY (verde) y los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Las imágenes fueron tomadas por microscopía confocal con objetivo 63X.

Adicionalmente, también se evaluó la presencia de las proteínas ocludina y ZO-1 las cuales se encuentran presentes en las uniones estrechas de los epitelios y median la unión paracelular célula-célula. Utilizando también como control positivo a las células Caco-2, se pudo evidenciar que en las células HTR8 a pesar de expresar estas proteínas, la unión estrecha mediada por ellas no llega a madurar (**Figura 21**), y no se observa el patrón de “malla de gallinero” de las células Caco-2, lo cual confirma el resultado obtenido con el BODI-PY.

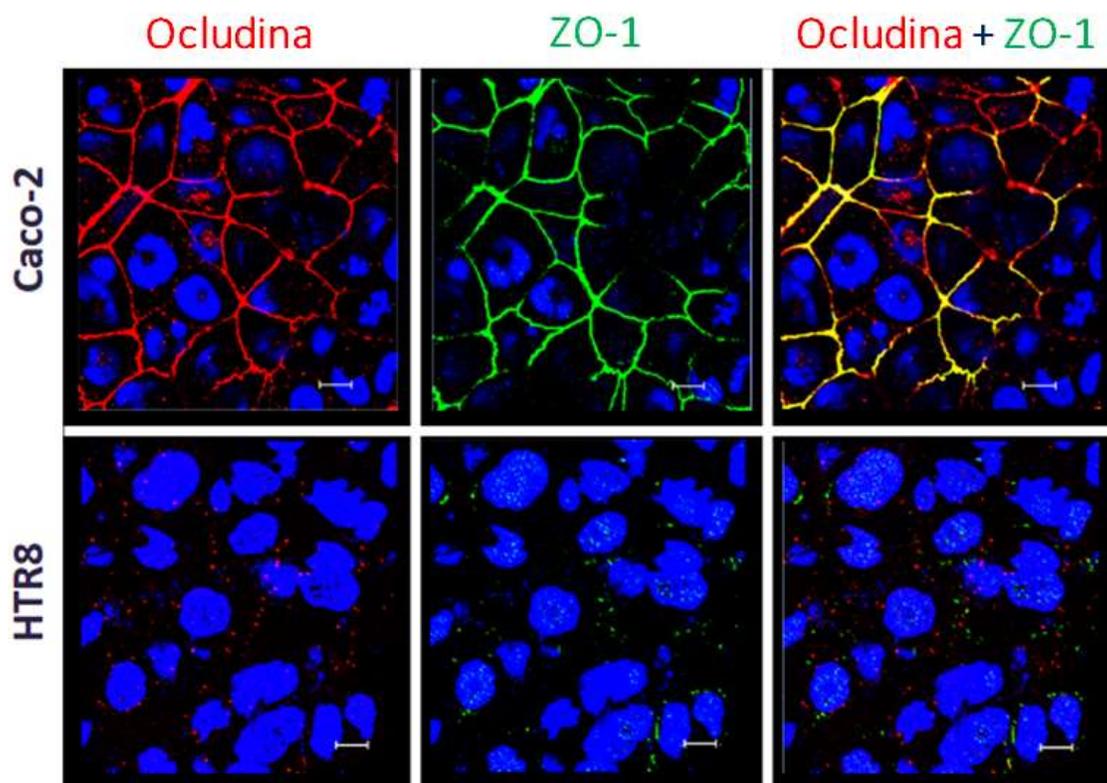


Figura 21: Expresión de las proteínas Ocludina y ZO-1 en células Caco-2 y HTR8.

Monocapas de células fueron fijadas y teñidas para Ocludina (rojo) y ZO-1 (verde), los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Las imágenes fueron tomadas por microscopía confocal con objetivo 30X (escala 10 μ m).

Luego de caracterizar la polaridad de las monocapas formadas por células HTR8, se procedió a realizar los ensayos de infección en co-cultivo de células HTR8 con MØ-M2. Se determinó la velocidad de infección de los macrófagos sembrados en el fondo del plato Transwell® a partir de células HTR8 sembradas e infectadas con los diferentes flavivirus en el filtro. Los macrófagos infectados se detectaron por IF marcando a la proteína viral NS3, los resultados se expresaron como porcentaje de células infectadas a diversos tiempos (3, 6, 9, 12, 24 y 48 hpi). En la **Figura 22**, se observa que a las 3 h luego de haber colocado los filtros con células HTR8 en el plato con los MØ-M2 sembrados en el fondo, éstos ya comienzan a estar infectados. A las 3 y 6 hpi no se observan diferencias significativas en el porcentaje de infección de los MØ-M2 expuestos a las células HTR8 infectadas con los distintos virus. Sin embargo, a partir de las 9 hpi si se observa un mayor porcentaje de MØ-M2 infectados por las cepas de ZIKV, alcanzando un porcentaje de infección > 96% versus 75% para DENV-2 y 86% para YFV-17D a las 48 hpi.

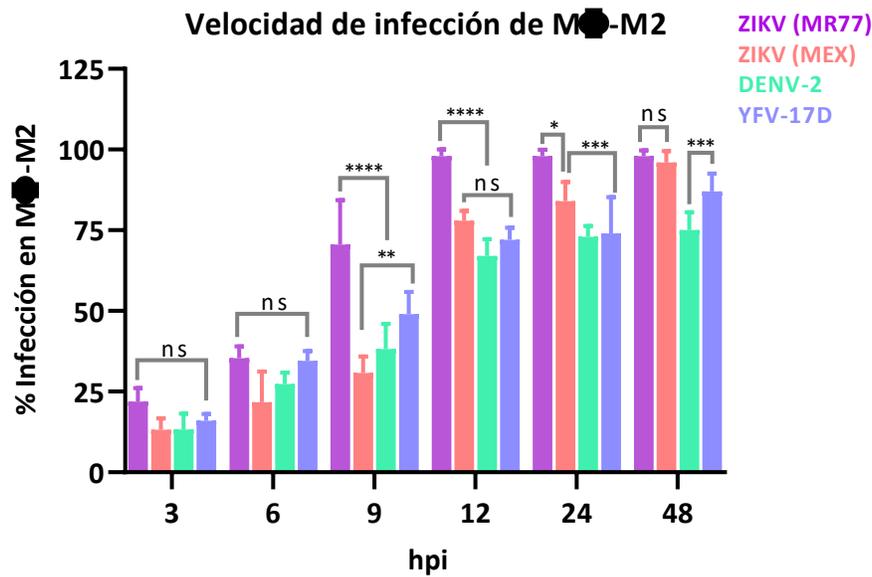


Figura 22: Velocidad de infección de MØ-M2 en co-cultivo con células HTR8 infectadas.

Los MØ-M2 infectados se tiñeron usando un Mab anti-NS3 de reactividad cruzada y los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas en relación con el número total de células teñidas con DAPI. El análisis estadístico se realizó a partir de las medias \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes (**** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.0003$; ** $p \leq 0.0082$; * $p \leq 0.0295$; ns, no significativo).

7.7. Activación diferencial de la maquinaria mTOR en células HTR8 infectadas

La maquinaria mTOR es una vía utilizada por varios virus de ARN para promover la replicación y evadir la respuesta antiviral (Vidotto *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2018; Chiramel & Best, 2018; Gratton *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2020; Sahoo *et al.*, 2020; Albentosa-González *et al.*, 2021). Para profundizar en las capacidades replicativas de ZIKV en células HTR8 se evaluó la activación de los complejos mTORC1 y mTORC2 en comparación con las cepas de DENV-2 y YFV-17D. La activación se midió por WB, detectando la expresión de las fracciones fosforiladas de S6K1 para mTORC1 (**Figura 23A**) y AKT-Ser473 para mTORC2 (**Figura 24A**). El análisis densitométrico de las bandas de WB mostró que en las células HTR8 infectadas con cepas de ZIKV hay una sobreactivación más rápida y fuerte de los complejos mTORC1 (**Figura 23B**) y mTORC2 (**Figura 24B**), que en las células infectadas con DENV-2 y YFV-17D. En las células infectadas por ZIKV-MR77, la activación de las vías mTORC1 y mTORC2 alcanzó su punto máximo a las 6 y 12 hpi, respectivamente; siendo esta activación 2 veces mayor a la inducida en células infectadas con las cepas DENV-2 y YFV-17D. Cabe destacar que para las células infectadas con ZIKV-MEX se observó una capacidad intermedia de activación de ambas vías, resultando significativas las diferencias en comparación con ZIKV-MR77, así como

con DENV-2 y YFV-17D (**Figuras 23B y 24B**). Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre las infecciones por DENV-2 y YFV-17D, que solo activaron las vías mTOR aproximadamente 0.5 veces por encima de los niveles basales (células MOCK). Este resultado sugiere que ZIKV es un fuerte inductor de la vía mTOR en las células HTR8, con diferencias significativas entre los linajes africano y asiático de ZIKV.

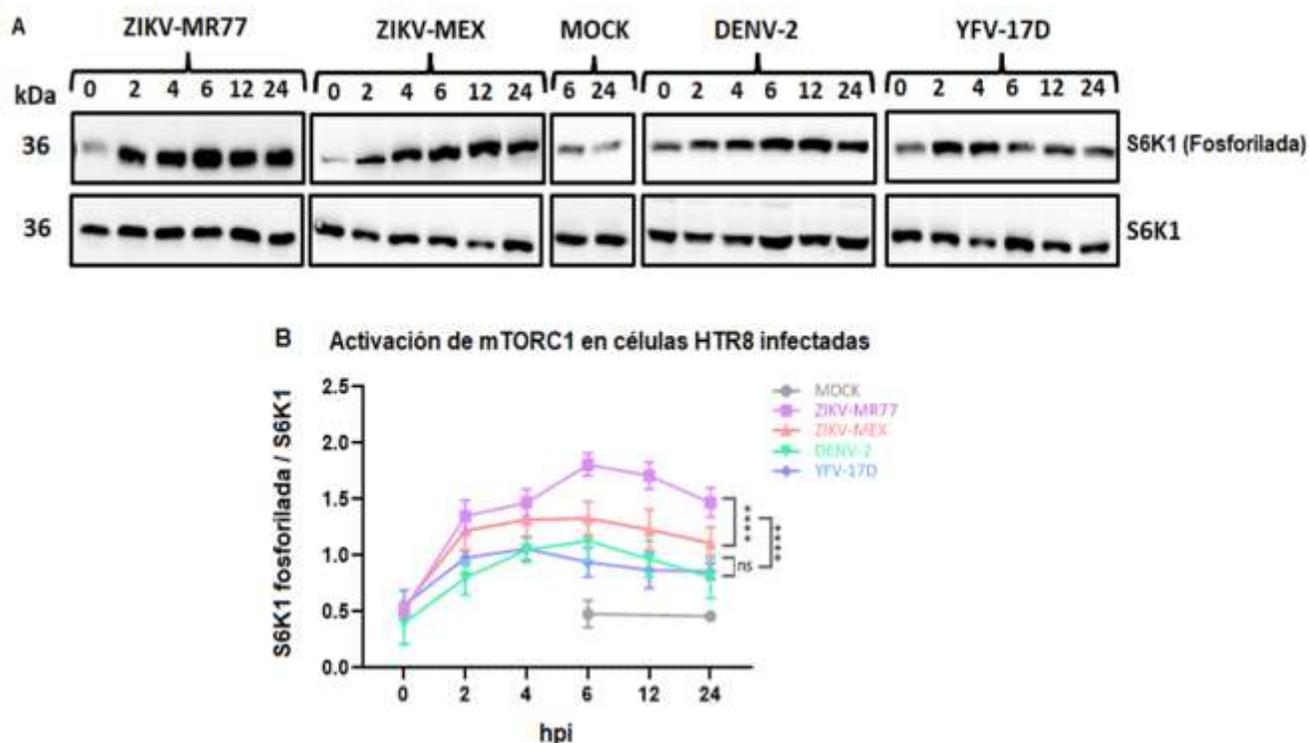


Figura 23: Activación de mTORC1 en células HTR8 infectadas.

Monocapas confluentes de células HTR8 infectadas con los diferentes flavivirus (MOI=3) o condición MOCK, fueron lisadas a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 12, 24 hpi). A. Los lisados se analizaron por WB y las intensidades de las bandas se evaluaron por densitometría. B. La activación de la vía mTORC1 fue normalizada por la relación S6K1 (fosforilada)/S6K1, los ensayos se realizaron por triplicado y el gráfico de líneas representa las medias \pm errores estándar (**** $p \leq 0.0001$; ns, no significativo).

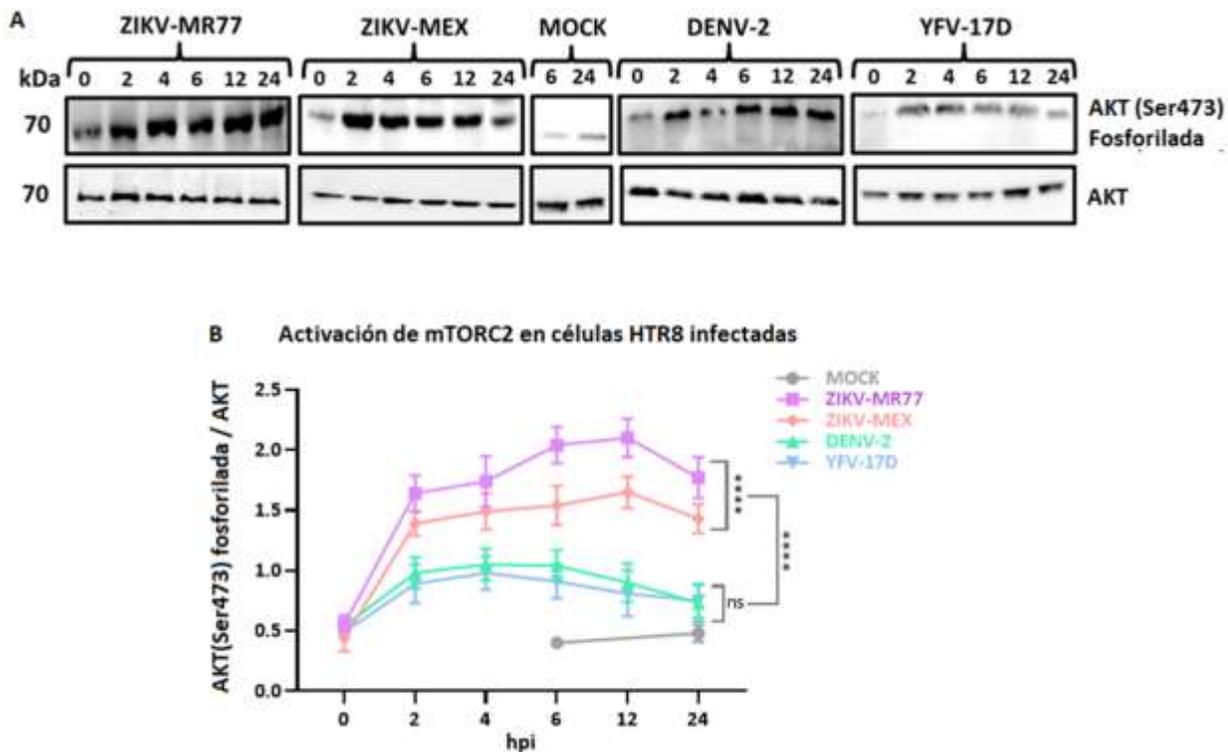


Figura 24: Activación de mTORC2 en células HTR8 infectadas.

Monocapas confluentes de células HTR8 infectadas con los diferentes flavivirus (MOI=3) o condición MOCK, fueron lisadas a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 12, 24 hpi). A. Los lisados se analizaron por WB y las intensidades de las bandas se evaluaron por densitometría. B. La activación de la vía mTORC2 fue normalizada por la relación AKT-Ser473 (fosforilada)/AKT, los ensayos se realizaron por triplicado y el gráfico de líneas representa las medias \pm errores estándar (**** $p < 0.0001$; ns, no significativo).

7.8. Inhibición de la maquinaria mTOR en células HTR8 infectadas

La rapamicina y el AZD8055 son inhibidores alostéricos de la actividad cinasa de la proteína mTOR (Huang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010). La rapamicina interactúa con el receptor intracelular FKBP12, formando un complejo que se une a la región C-terminal del dominio de unión de rapamicina FKBP12, inhibiendo las funciones de señalización de mTOR en sus blancos río abajo (Li *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 2019). Este fármaco inhibe principalmente a mTORC1, impidiendo el enlace de mTOR con Raptor reduciendo su actividad cinasa. También se ha descrito que altas dosis de rapamicina por tiempos prolongados pueden impedir el ensamblaje del complejo mTORC2 (Li *et al.*, 2014; Schreiber *et al.*, 2019 Zhou *et al.*, 2010). AZD8055 actúa como inhibidor competitivo del ATP, bloqueando la fosforilación de los sustratos mTORC1 (S6K1 y 4E-BP19) y mTORC2 (AKT-Ser473 y

proteínas río abajo), impidiendo principalmente la activación de AKT (Huang *et al.*, 2011; Preuss *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2010).

Ambos fármacos fueron utilizados para evaluar el impacto de la maquinaria mTOR sobre la replicación viral y determinar si la infección por ZIKV es más dependiente de esta vía que DENV2 y YFV-17D. Los resultados de la viabilidad celular indican que las células permanecen metabólicamente viables después de las 48 horas posteriores al tratamiento. En la **Figura 24A**, se muestra que entre el 95 y 98% de las células tratadas con Rapamicina (100; 10; 1 y 0.1 nM) permanecen viables. Asimismo, entre el 96 y 100% de las células tratadas con AZD8055 (10,000; 1,000; 100 y 10 nM) permanecieron metabólicamente activas (**Figura 24B**), ambos grupos de células fueron comparadas con las condiciones de cultivo sin tratamiento y con DMSO.

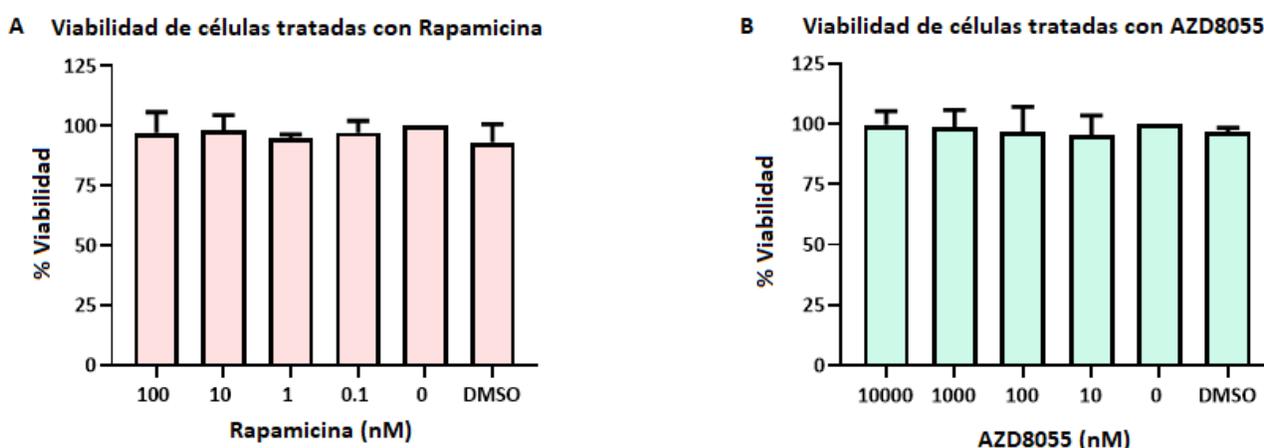


Figura 25: Viabilidad de células HTR8 tratadas con inhibidores de mTOR.

A. Células HTR8 tratadas por 48 h con diferentes concentraciones de Rapamicina. B. Células HTR8 tratadas por 48 h con diferentes concentraciones de AZD8055. Se utilizó el kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay para medir la actividad mitocondrial, la cual se cuantificó espectrofotométricamente a 490 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje y las gráficas de barra representa el promedio de tres experimentos independientes.

Las células HTR8 se trataron con Rapamicina (100 nM) y AZD8055 (10,000 nM) durante 24 h, posteriormente se infectaron con los diferentes flavivirus usando MOI = 3 y se evaluó la expresión de NS3 y la progenie viral a las 24 hpi. Los resultados indicaron que la concentración utilizada de Rapamicina inhibió la activación de mTORC1, pero no de mTORC2, mientras que la concentración usada de AZD8055 inhibió ambas vías (**Figura 25; Figura 26A y B**), esto concuerda con lo reportado en la literatura (Huang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Preuss

et al., 2013). Ambos tratamientos dieron como resultado una reducción significativa de los niveles de expresión de NS3 (**Figura 25; Figura 26C**); no obstante, diferencias significativas entre los tratamientos con Rapamicina y AZD8055 no fueron observadas. Esto podría sugerir que el complejo mTORC1 es de mayor importancia para la replicación viral que mTORC2. La progenie viral de las 4 cepas analizadas se redujo significativamente en las células tratadas, observándose una mayor reducción para ZIKV-MR77 (> 1 log). Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en los títulos virales de las células tratadas con Rapamicina o AZD5088, lo que refuerza la idea de que mTORC1 es el complejo de mayor relevancia para la replicación viral (**Figura 27**).

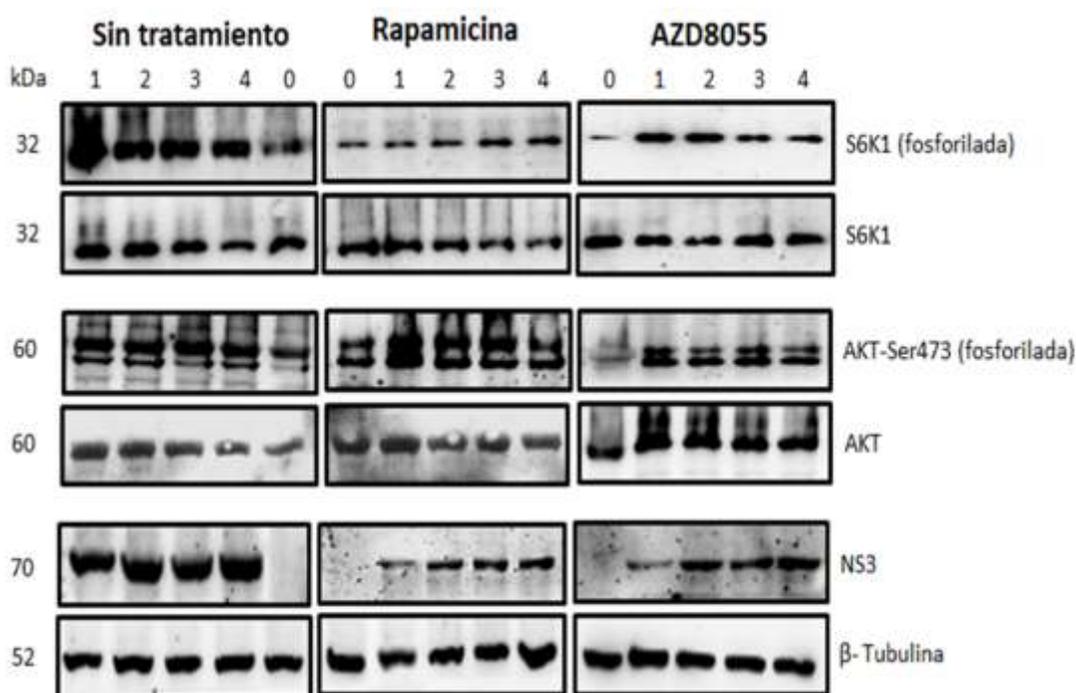
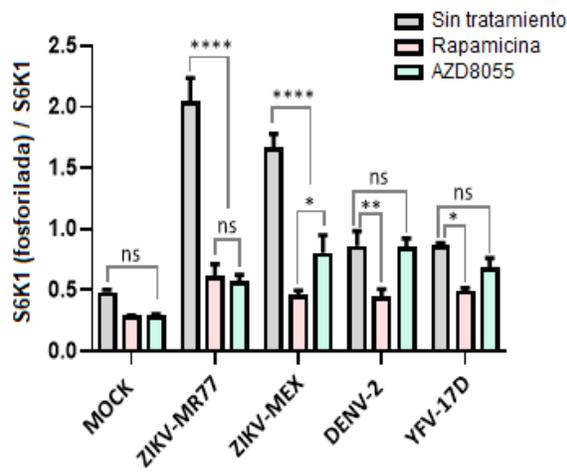


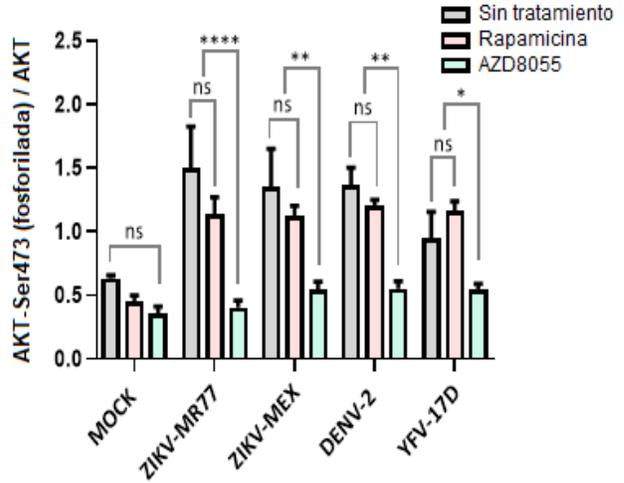
Figura 26: Ensayos de WB que evidencian el efecto de la inhibición de la vía mTOR sobre la expresión de NS3.

Las células HTR8 se pretrataron con rapamicina o AZD8055 durante 24 h antes de la infección viral. Veinticuatro horas después de la infección, se lisaron las células y los extractos proteicos fueron analizados por WB (0: MOCK; 1: ZIKV-MR77; 2: ZIKV-MEX; 3: DENV2; 4: YFV-17D) para evaluar la expresión de las fracciones fosforiladas de mTORC1 S6K1) y mTORC2 (AKT-Ser473), la expresión de la proteína viral NS3 se normalizó con la proteína endógena β -Tubulina. Los resultados de las bandas de WB son una muestra de tres experimentos independientes.

A Inhibición de mTORC1



B Inhibición de mTORC2



C Expresión de NS3

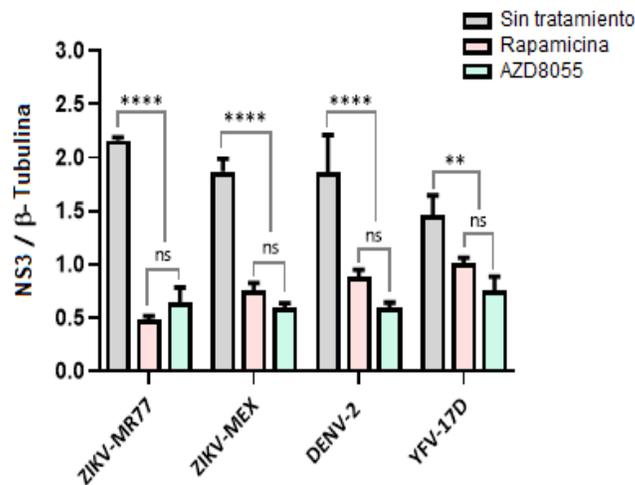


Figura 27: Efecto del tratamiento con Rapamicina y AZD8055 sobre la inhibición de la vía mTOR y la expresión de NS3.

Las bandas de WB de tres experimentos independientes fueron analizadas por densitometría para evaluar el efecto de los fármacos inhibidores sobre cada uno de los complejos mTOR y la expresión de NS3. A. Expresión de la fracción fosforilada de S6K1 normalizada con la fracción no fosforilada. B. Expresión de la fracción fosforilada de AKT-Ser473 normalizada con la fracción no fosforilada. C. Expresión de la proteína viral NS3 normalizada con β -Tubulina como control endógeno. Los gráficos de barra muestran las medias \pm desviaciones estándar de 3 experimentos independientes (**** $p \leq 0.0001$; ** $p \leq 0.0065$; * $p \leq 0.0229$; ns, no significativo).

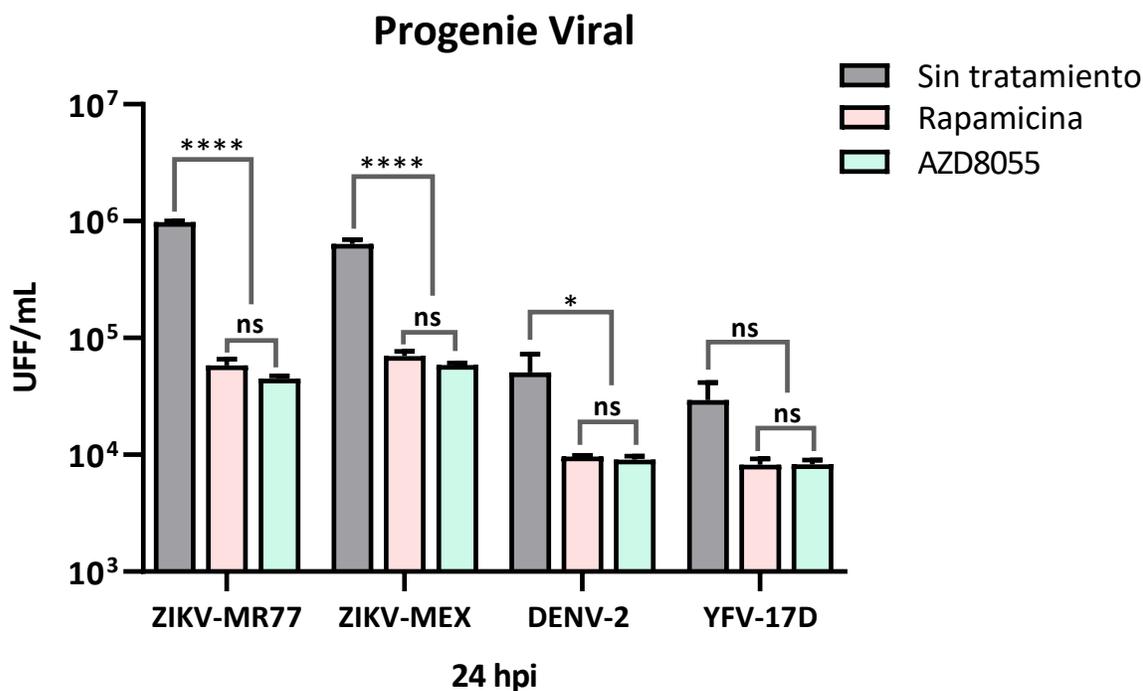


Figura 28: Efecto de la inhibición de la vía mTOR sobre la progenie viral.

Los sobrenadantes colectados a las 24 hpi de células tratadas y sin tratamiento, fueron utilizados para determinar la progenie viral por ensayo de formación de focos. Las barras expresan las medias \pm desviaciones estándar de al menos 3 experimentos independientes (**** $p \leq 0.0001$; * $p \leq 0.0229$; ns, no significativo).

7.9. Perfil de secreción de citocinas en células HTR8 y macrófagos M2

La respuesta inmune innata es un importante sistema de defensa en la interfase materno-placentaria. El delicado equilibrio entre las respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias es crucial para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo del feto semialogénico (Koi *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2018). Debido a ello en este trabajo se evaluó el perfil de citocinas generado por células HTR8 y MØ-M2 infectados con los virus ZIKV-MR77, ZIKV-MEX DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal).

Los sobrenadantes de las células infectadas y la condición MOCK, fueron recolectados a las 6, 24, 48, 72 hpi, la cuantificación de las diferentes citocinas se realizó por citometría con perlas fluorescentes específicas para cada citocina. La infección de las células HTR8 con las cepas de ZIKV se caracterizó por niveles altos de IL-1 β , IL-6, TNF α , así como niveles bajos de CCL-3, IP-10, VEGF, IFN-2 α e IFN- γ , en comparación con los perfiles secretados por las células infectadas con DENV-2 y YFV-17D (Figura 28; Tabla 5). Las diferencias entre las cepas

de ZIKV y DENV-2 y YFV-17D fueron particularmente evidentes para CCL-3, IP-10 y los IFNs. Estos resultados sugieren que en las células HTR8 la infección con ZIKV modula negativamente la producción de quimiocinas quimioatrayentes y la respuesta antiviral mediada por IFNs. Esta capacidad de eludir la respuesta innata antiviral podría jugar un papel importante en el cruce de la barrera hematoplacentaria.

En células macrofágicas, el perfil de citocinas inducido fue más robusto. Sin embargo, a excepción de CCL-7 las diferencias entre las cepas ZIKV y las cepas DENV-2 y YFV-17D fueron menos evidentes. Aun así, la infección con ZIKV-MR77 generó una mayor respuesta inflamatoria y quimiotáctica con valores superiores de IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL2, CCL3, CCL7, CXCL8, IP-10 y VEGF, que el resto de las cepas. Asimismo, se volvió a observar una baja respuesta mediada por IFNs (Figura 29; Tabla 6). Estos resultados sugieren que, si bien la capacidad de ZIKV de inducir un perfil proinflamatorio en conjunto con una baja respuesta antiviral no es determinante para su establecimiento en el núcleo de las microvellosidades, si puede estar favoreciendo el ingreso de ZIKV a la circulación fetal a través de la infección de las células del endotelio vascular que recubren los capilares fetales.

Tabla 4: Perfil de citocinas, interferones y quimiocinas secretado por células HTR8 infectadas con los diferentes flavivirus.

Los sobrenadantes de cada condición fueron colectados a diferentes tiempos (6, 24, 48 y 72 hpi). Cada valor representa las concentraciones (pg/mL) medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (****p, \leq 0.0001; *p, \leq 0.046; ns, no significativo).

Condición	hpi	Citocinas (pg/mL)					Interferones (pg/mL)	
		IL-1 β	IL-6	IL-10	IL-15	TNF α	INF-2 α	INF- γ
MOCK	6	13 \pm 0.5	14 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	3 \pm 0.3	2 \pm 0.3	5 \pm 1
	24	13 \pm 0.1	54 \pm 2	0.5 \pm 0.1	2 \pm 0.1	6 \pm 0.3	4 \pm 2	6 \pm 0.2
	48	13 \pm 0.1	76 \pm 3	2 \pm 0.1	4 \pm 0.1	7 \pm 0.1	8 \pm 2	7 \pm 1
	72	15 \pm 0.1	192 \pm 1	2 \pm 0.1	15 \pm 4	9 \pm 0.1	11 \pm 1	15 \pm 1
ZIKV-MR77	6	19 \pm 0.5	15 \pm 1	2 \pm 0.7	1 \pm 0.1	19 \pm 0.2	4.4 \pm 2	7. \pm 1
	24	19 \pm 0.5	82 \pm 1	3 \pm 0.2	3 \pm 0.5	22 \pm 0.3	6 \pm 3	10 \pm 3
	48	21 \pm 2	275 \pm 22	3 \pm 0.1	6 \pm 0.6	61 \pm 0.1	9 \pm 3	32 \pm 6
	72	25 \pm 1	4025 \pm 330	3 \pm 0.1	25 \pm 4	80 \pm 0.4	11 \pm 1	65 \pm 8
ZIKV-MEX	6	14 \pm 1	11 \pm 1	1 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	11 \pm 0.5	4 \pm 2	6 \pm 1
	24	16 \pm 1	45 \pm 1	3 \pm 0.1	2 \pm 0.2	14 \pm 0.1	6 \pm 1	8 \pm 2
	48	16 \pm 1	117 \pm 1	3 \pm 0.1	8 \pm 1	22 \pm 0.2	9 \pm 3	20 \pm 7
	72	19 \pm 3	1177 \pm 80	5 \pm 0.1	16 \pm 3	50 \pm 0.2	11 \pm 3	60 \pm 9
DENV-2	6	13 \pm 0.2	105 \pm 7	2 \pm 0.7	10 \pm 1	9 \pm 0.1	135 \pm 8	10 \pm 1
	24	13 \pm 0.2	165 \pm 12	3 \pm 0.1	13 \pm 1	12 \pm 0.1	161 \pm 22	14 \pm 2
	48	15 \pm 0.2	793 \pm 38	10 \pm 0.2	20 \pm 1	22 \pm 0.3	155 \pm 28	20 \pm 3
	72	17 \pm 0.2	3631 \pm 431	22 \pm 3	34 \pm 3	41 \pm 0.6	123 \pm 13	109 \pm 3
YFV-17D	6	13 \pm 0.2	30 \pm 1	1 \pm 0.5	0.7 \pm 0.2	11 \pm 0.4	41 \pm 25	8 \pm 2
	24	14 \pm 0.2	94 \pm 4	2 \pm 0.1	2 \pm 1	14 \pm 0.1	56 \pm 13	11 \pm 4
	48	15 \pm 0.2	540 \pm 32	4 \pm 0.5	7 \pm 1	24 \pm 0.3	137 \pm 13	31 \pm 5
	72	16 \pm 0.2	2268 \pm 534	8 \pm 0.7	21 \pm 1	49 \pm 0.1	179 \pm 22	115 \pm 6

Continuación tabla 4.

Condición	hpi	Quimiocinas (pg/mL)					
		MCP1 / CCL2	MIP1 α / CCL3	MCP3 / CCL7	IL-8 / CXCL8	IP-10 / CXCL10	VEGF
MOCK	6	39 \pm 3	0.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.5	15 \pm 2	2 \pm 0.2	6 \pm 0.2
	24	242 \pm 17	1.1 \pm 0.1	12 \pm 2	84 \pm 6	6 \pm 0.7	19 \pm 3
	48	1014 \pm 102	1.2 \pm 0.2	30 \pm 1	193 \pm 21	14 \pm 3	29 \pm 0.1
	72	6677 \pm 104	1.3 \pm 0.2	101 \pm 9	466 \pm 52	21 \pm 3	81.4 \pm 0.1
ZIKV-MR77	6	87 \pm 10	1 \pm 0.3	7 \pm 1	19 \pm 2	20 \pm 2	6 \pm 0.2
	24	299 \pm 7	1.2 \pm 0.4	18 \pm 1	102 \pm 1	38 \pm 5	12 \pm 2
	48	8185 \pm 329	1.3 \pm 0.4	95 \pm 3	256 \pm 36	73 \pm 8	55 \pm 3
	72	8825 \pm 112	1.4 \pm 0.5	352 \pm 32	3533 \pm 306	158 \pm 12	234 \pm 2
ZIKV-MEX	6	34 \pm 3	0.8 \pm 0.1	5 \pm 0.2	24 \pm 4	2 \pm 0.3	6 \pm 0.2
	24	255 \pm 21	1.1 \pm 0.4	10 \pm 1	115 \pm 16	6 \pm 0.2	13 \pm 2
	48	7561 \pm 269	1.3 \pm 0.2	39 \pm 1	199 \pm 19	12 \pm 0.5	24 \pm 4
	72	8244 \pm 324	1.3 \pm 0.3	405 \pm 15	3036 \pm 483	56 \pm 0.5	60 \pm 4
DENV-2	6	242 \pm 40	0.9 \pm 0.2	19 \pm 0.2	58 \pm 13	6 + 1	266 + 10
	24	534 \pm 30	1.1 \pm 0.3	28 \pm 0.5	198 \pm 42	12 + 1	272 + 3
	48	7684 \pm 126	2.8 \pm 0.2	218 \pm 26	2815 \pm 463	25 + 2	527 + 104
	72	8613 \pm 341	19 \pm 0.2	330 \pm 70	4119 \pm 631	36 + 4	1002 + 22
YFV-17D	6	70 \pm 6	0.9 \pm 0.1	2 \pm 0.1	15 \pm 4	7 \pm 0.4	7 \pm 0.2
	24	118 \pm 19	1.3 \pm 0.1	15 \pm 0.3	81 \pm 3	13 \pm 1	11 \pm 2
	48	7300 \pm 600	2.4 \pm 0.4	152 \pm 7	504 \pm 103	1498 \pm 32	19 \pm 3
	72	8395 \pm 270	20 \pm 1.9	523 \pm 13	4145 \pm 235	3650 \pm 450	451 \pm 89

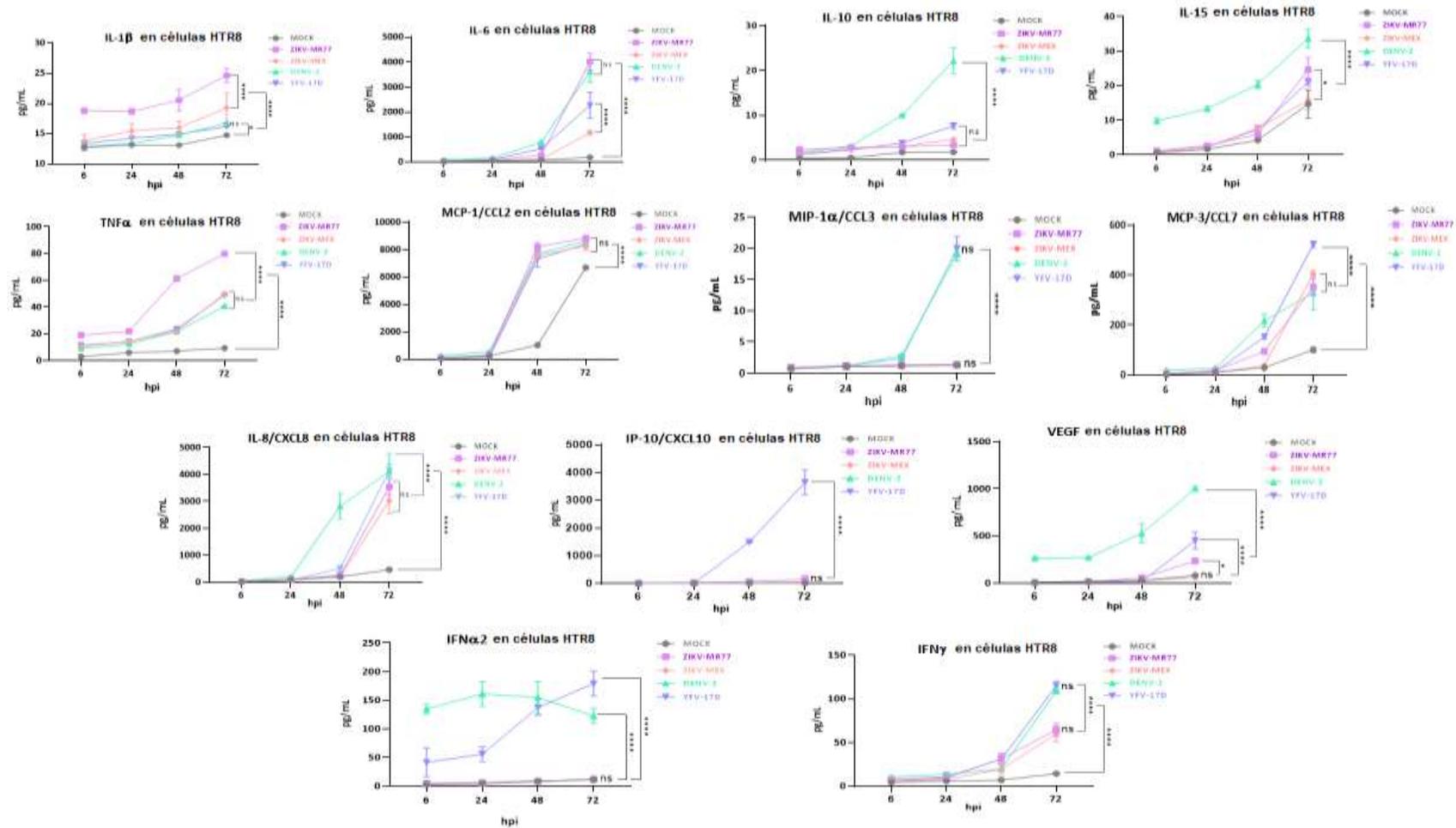


Figura 29: Perfil de citocinas, quimiocinas e interferones secretado por células HTR8 infectadas con los diferentes flavivirus.

Monocapas confluentes de células HTR8 sembradas en placas de 24 pozos fueron infectadas (MOI: 3), los sobrenadantes de cada condición fueron colectados a diferentes tiempos. Las gráficas representan concentraciones (pg/mL) medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (**** p , ≤ 0.0001 ; ** p , ≤ 0.046 ; ns, no significativo).

Tabla 5: Perfil de citocinas, interferones y quimiocinas secretado por MØ-M2 infectados con los diferentes flavivirus.

Los sobrenadantes de cada condición fueron colectados a diferentes tiempos (6, 24, 48 y 72 hpi). Cada valor representa las concentraciones (pg/mL) medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (****p \leq 0.0001; ***p \leq 0.0008; **p \leq 0.0056; *p, \leq 0.0461; ns, no significante).

Condición	hpi	Citocinas (pg/mL)					Interferones (pg/mL)	
		IL-1 β	IL-6	IL-10	IL-15	TNF α	INF-2 α	INF- γ
MOCK	6	49 \pm 7	3 \pm 0.2	21 \pm 1	0.75 \pm 0.06	115 \pm 17	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4
	24	103 \pm 5	9 \pm 1	52 \pm 4	1.10 \pm 0.11	389 \pm 18	1.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4
	48	204 \pm 11	20 \pm 1	89 \pm 7	2.50 \pm 0.10	766 \pm 30	3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2
	72	300 \pm 2	34 \pm 2	123 \pm 23	3.38 \pm 0.13	910 \pm 7	4 \pm 0.6	1.2 \pm 0.2
ZIKV-MR77	6	68 \pm 3	12 \pm 2	155 \pm 27	4 \pm 0.3	387 \pm 19	21 \pm 0.5	1.4 \pm 0.4
	24	154 \pm 9	19 \pm 2	332 \pm 74	6 \pm 0.4	581 \pm 36	21 \pm 0.3	3.2 \pm 0.2
	48	433 \pm 74	35 \pm 5	438 \pm 48	13 \pm 0.2	3998 \pm 82	22 \pm 0.3	3.4 \pm 0.2
	72	1125 \pm 137	71 \pm 2	1029 \pm 16	23 \pm 0.4	5338 \pm 282	22 \pm 0.9	3.8 \pm 0.3
ZIKV-MEX	6	24 \pm 3	6 \pm 1	28 \pm 1	3.4 \pm 1	311 \pm 85	21 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1
	24	79 \pm 18	18 \pm 2	183 \pm 62	6.4 \pm 1	676 \pm 139	31 \pm 0.7	1.8 \pm 0.1
	48	222 \pm 10	26 \pm 3	415 \pm 40	11 \pm 0.3	4025 \pm 984	31 \pm 1	2.2 \pm 0.1
	72	417 \pm 8	48 \pm 2	762 \pm 94	20 \pm 1	5350 \pm 450	32 \pm 2	2.2 \pm 0.1
DENV-2	6	22 \pm 1	10 \pm 0.2	30 \pm 5	7 \pm 1	90 \pm 7	57 \pm 1	4.1 \pm 0.1
	24	89 \pm 8	27 \pm 1	131 \pm 5	12 \pm 2	125 \pm 7	61 \pm 1	11 \pm 0.7
	48	235 \pm 9	48 \pm 2	340 \pm 10	17 \pm 1	537 \pm 106	76 \pm 0.5	19 \pm 0.3
	72	624 \pm 32	72 \pm 4	415 \pm 35	22 \pm 0.5	5690 \pm 451	129 \pm 3	25 \pm 1.7
YFV-17D	6	186 \pm 1	36 \pm 4	197 \pm 7	4 \pm 0.3	331 \pm 28	48 \pm 8	3.7 \pm 0.4
	24	248 \pm 23	47 \pm 2	310 \pm 34	11 \pm 1	657 \pm 95	65 \pm 6	15 \pm 1.5
	48	404 \pm 12	64 \pm 0.2	357 \pm 16	17 \pm 0.3	1148 \pm 188	68 \pm 4	27 \pm 1.5
	72	583 \pm 41	71 \pm 1	833 \pm 85	21 \pm 0.4	6445 \pm 1045	93 \pm 14	34 \pm 2

Continuación tabla 5.

Condición	hpi	Quimiocinas (pg/mL)					
		MCP1 / CCL2	MIP1 α / CCL3	MCP3 / CCL7	IL-8 / CXCL8	IP-10 / CXCL10	VEGF
MOCK	6	3712 \pm 109	399 \pm 8	726 \pm 53	3236 \pm 97	42 \pm 5	705 \pm 153
	24	5017.5 \pm 265	1119 \pm 8	1554.5 \pm 179.5	4068 \pm 38	52 \pm 4	812 \pm 72
	48	5876.5 \pm 137	1619 \pm 4	2877.5 \pm 105.5	4718 \pm 113	113 \pm 3	686 \pm 8
	72	7155 \pm 1409	2061 \pm 9	4566 \pm 81	5437 \pm 197	138 \pm 10	1621 \pm 51
ZIKV-MR77	6	5071 \pm 577	830 \pm 40	1400 \pm 100	3847 \pm 202	193 \pm 14	1846 \pm 135
	24	6819 \pm 241	2110 \pm 220	6822 \pm 764	4900 \pm 76	292 \pm 80	2579 \pm 191
	48	13076 \pm 9711	2305 \pm 75	8455 \pm 12	6491 \pm 89	432 \pm 17	3923 \pm 174
	72	47760 \pm 7464	3183 \pm 88	10555 \pm 685	10113 \pm 303	552 \pm 62	5979 \pm 593
ZIKV-MEX	6	5581 \pm 601	843 \pm 53	5402 \pm 1246	4691 \pm 93	49 \pm 3	169 \pm 31
	24	7397 \pm 210	2129 \pm 384	6965 \pm 135	4958 \pm 55	128 \pm 7	1474 \pm 3
	48	9674 \pm 149	2754 \pm 74	10403 \pm 628	6001 \pm 551	235 \pm 11	1926 \pm 66
	72	11550 \pm 650	3273 \pm 81	12695 \pm 965	6848 \pm 101	324 \pm 12	4078 \pm 619
DENV-2	6	5753 \pm 368	427 \pm 5	1558 \pm 250	4781 \pm 139	72 \pm 6	135 \pm 1
	24	6342 \pm 133	944 \pm 34	1914 \pm 31	5667 \pm 501	105 \pm 1	171 \pm 26
	48	9012 \pm 99	1727 \pm 10	1963 \pm 27	6207 \pm 419	128 \pm 21	573 \pm 18
	72	9899 \pm 48	2403 \pm 65	3581 \pm 344	7502 \pm 372	159 \pm 1	1856 \pm 58
YFV-17D	6	4882 \pm 526	1073 \pm 27	1132 \pm 206	3255 \pm 95	186 \pm 50	1651 \pm 108
	24	6464 \pm 695	1665 \pm 11	1560 \pm 121	3737 \pm 47	298 \pm 14	1890 \pm 10
	48	7911 \pm 49	1995 \pm 1	2694 \pm 1077	4003 \pm 1	353 \pm 34	2186 \pm 155
	72	9784 \pm 569	2483 \pm 78	5827 \pm 1736	5787 \pm 257	413 \pm 4	3751 \pm 711

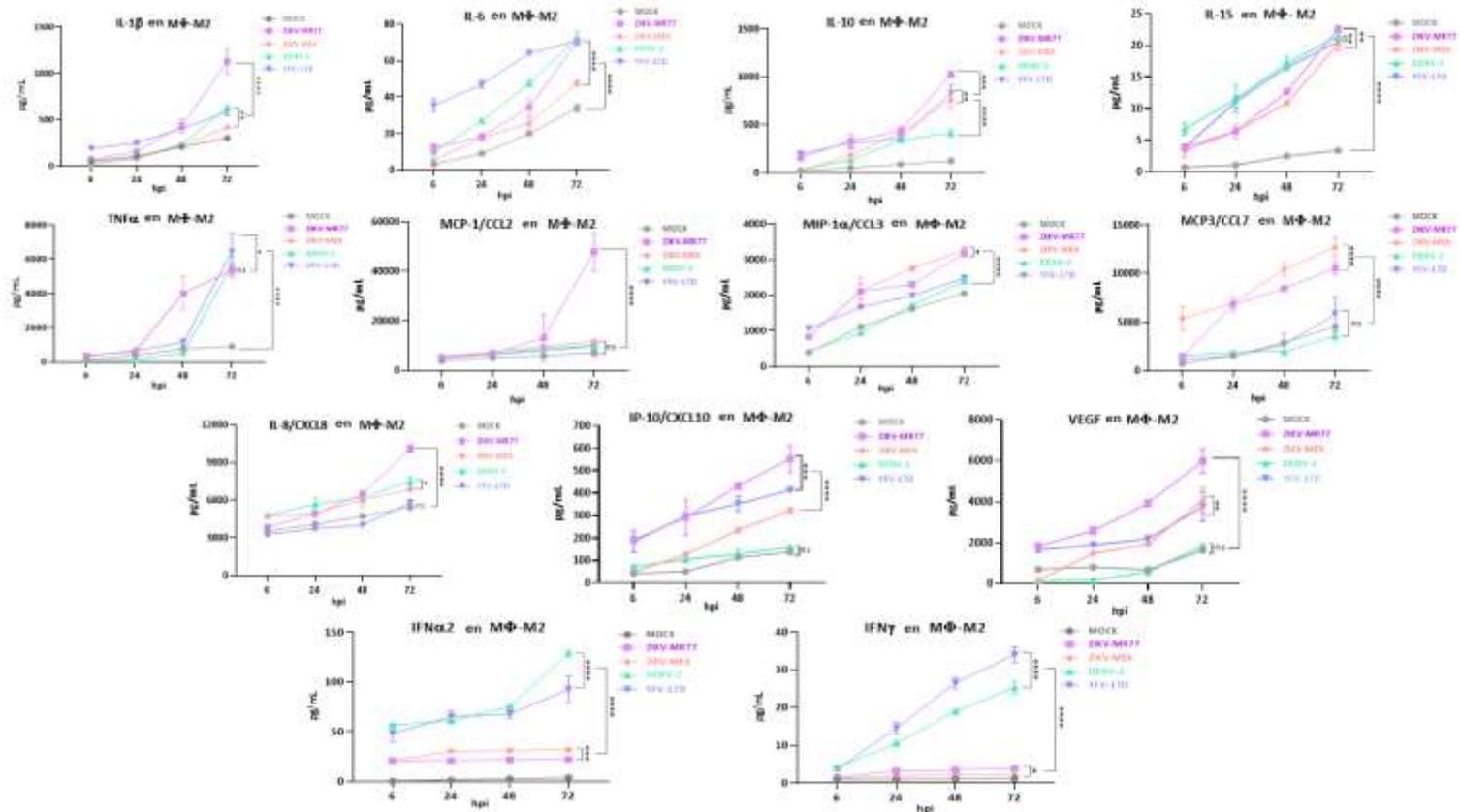


Figura 30: Perfil de citocinas, quimiocinas e interferones secretado por MØ-M2 infectados con los diferentes flavivirus.

Monocapas confluentes de MØ-M2 sembrados en placas de 24 pozos fueron infectadas (MOI: 3), los sobrenadantes de cada condición fueron colectados a diferentes tiempos (6, 24, 48 y 72 hpi). Las gráficas representan los valores de las concentraciones (pg/mL) medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (****p < 0.0001; ***p < 0.0008; **p < 0.0056; *p, < 0.0461; ns, no significativo).

VIII. DISCUSIÓN

El ZKV es un virus neurotrópico caracterizado como un patógeno TORCH por su alto potencial teratogénico (Arora *et al.*, 2017; Coyne y Lazaar, 2016). Su transmisión vertical genera abortos y malformaciones neurológicas conocidas como Síndrome Congénito asociado a Zika (SCZ) (Driggers *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2020; Rasmussen *et al.*, 2016). Sin embargo, otros flavivirus filogenéticamente relacionados como el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla (Holbrook, 2017; Lindenbach *et al.*, 2013; Musso y Gubler, 2016), no se han reportado como patógenos TORCH (Suzano *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2017).

En las microvellosidades placentarias las células que conforman el STB son refractarias a infección por ZIKV, debido a la secreción de IFN λ (Bayer *et al.*, 2016). En contraste, las células del CTB y las HBCs sí son susceptibles a ZIKV, siendo células blanco para la infección y replicación viral en el estroma placentario, permitiendo la propagación del virus hasta los capilares fetales (Martinez y Pickett, 2018; Noronha *et al.*, 2016; Quicke *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2017; Tabata *et al.*, 2018). Actualmente, se han propuesto algunos modelos para explicar el establecimiento de la infección de ZIKV en el núcleo de las microvellosidades placentarias: i) la infección a través de las deciduas maternas (basal y parietal) (Tabata *et al.*, 2016), ii) transcitosis mediada por inmunocomplejos con anticuerpos anti-DENV (Zimmerman *et al.*, 2018) y iii) a través de la ruta paracelular por disrupción de las uniones estrechas del STB por disminución de la expresión de las proteínas claudina-4, ocludina y ZO-1 (Chiu *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2019). No obstante, los mecanismos utilizados por el virus de Zika para cruzar la barrera hematoplacentaria no se conocen por completo y representan un enigma a descifrar.

Considerando el grave problema a nivel social que generó y aún sigue generando el SCZ, así como también, su impacto en la salud pública, en la presente investigación se realizó un estudio comparativo de infección por los flavivirus de ZIKV (linajes africano y asiático), DENV- 2 y YFV-17D (cepa vacunal) en dos modelos celulares (HTR8 y MØ-M2) representativos de las microvellosidades placentarias. Ello con la idea de descifrar aspectos únicos de la infección por ZIKV en la placenta.

Los ensayos de infección en células HTR8 con los flavivirus previamente mencionados, indican una susceptibilidad de infección y replicación por las cuatro cepas virales (Figura 18A, 19B). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Luo *et al.*, (2018), en la misma línea celular. No obstante, nuestros resultados indican que ambas cepas de ZIKV poseen mayor eficiencia de infección y replicación en estas células en comparación con DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal); siendo ésta eficiencia superior con ZIKV del linaje africano. Este hallazgo contrasta con lo reportado por Luo *et al.*, (2018), quienes, al observar mínimas diferencias en los títulos virales en células infectadas con ZIKV (linaje asiático cepa FSS13025), DENV-4 (cepa 703-4) y YFV-17D (cepa vacunal), concluyen que es poco probable que el SCZ se deba a un tropismo diferencial de estos virus por células citotrofoblásticas. Los datos contrastantes pueden derivar de las distintas cepas virales, el uso de diferentes multiplicidades de infección y tiempos de recolección demasiado tardíos (días en lugar de horas), empleados en el trabajo citado.

Las HBCs, conocidas como macrófagos placentarios, son células implicadas en la transmisión vertical de ZIKV y en la diseminación de la infección a la circulación fetal (Lian *et al.*, 2019; Ngoni *et al.*, 2018; Quicke *et al.*, 2016). Como modelo de HBCs partimos de células monocíticas U937-DC-SIGN, que fueron diferenciadas y polarizadas a MØ-M2, previo a los ensayos de infección. El proceso de diferenciación se confirmó por expresión de los receptores CD14, CD163 y CD209 (**Figura 15, 17A y 17B**) presentes en macrófagos placentarios (Thomas *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2019). Los MØ-M2 fueron susceptibles a infección por las cuatro cepas virales evaluadas, evidenciando altos títulos y porcentajes de infección superiores a los observados en células HTR8 (**Figura 18B, 19B**). Este resultado es congruente con lo reportado para varias células del sistema fagocítico mononuclear en sangre periférica, las cuales representan un blanco primario de infección para varios flavivirus (Kou *et al.*, 2008; Oliveira & Peron, 2019). Tal como se observó en la infección de células HTR8, ambas cepas de ZIKV resultaron ser más eficientes en términos de infección y replicación, aunque estas diferencias con respecto a DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal) fueron menos marcadas. Vale la pena resaltar que el porcentaje de infección en MØ-M2 desde las 24 hpi fue > 90% en contraste con $\leq 27\%$ en células HTR8 alcanzado a las 96 hpi (**Figura 19**). Esto indica que los MØ-M2 son altamente permisivos a la infección por las cepas virales evaluadas sugiriendo que las HBCs, en términos de susceptibilidad de infección, podrían ser un terreno fértil para el establecimiento de

ZIKV, DENV y YFV una vez que estos virus alcanzan el estroma placentario. Los resultados obtenidos en las células HTR8 y MØ-M2, tomados en conjunto, sugieren que sobre las células citotrofoblásticas recae la responsabilidad del ingreso de ZIKV y depende de la amplificación en los macrófagos, su posterior establecimiento en las microvellosidades placentarias (Tabata *et al.*, 2016; 2018).

El receptor DC-SIGN o CD209 es una lectina tipo C que representa el receptor de entrada viral mejor caracterizado para DENV y otros flavivirus (Fishburn *et al.*, 2022; Shah *et al.*, 2013). Las células monocíticas de las cuales partimos para la diferenciación a MØ-M2 son DC-SIGN positivas y por lo tanto ampliamente utilizadas en ensayos de infección con flavivirus. A través de citometría de flujo se evaluó la expresión de este receptor en las células HTR8 usando MØ-M2 como células control, los resultados mostraron que las células HTR8 carecen del receptor DC-SIGN en su superficie (**Figura 17C**), indicando que el proceso de adhesión viral de los flavivirus evaluados es mediado por uno o varios receptores de entrada viral diferentes a DC-SIGN. Probablemente la ausencia de este receptor en las células HTR8 está relacionada con la baja susceptibilidad de infección en comparación con los MØ-M2. Sin embargo, es necesario caracterizar en la superficie de células HTR8 la presencia o ausencia de los diferentes receptores que interactúan con la proteína E, para poder confirmar esta hipótesis. A pesar del bajo porcentaje de infección observado en las células HTR8, los valores de virus yield/célula (**Tabla. 3**) indican que estas células son más permisivas para la replicación de las cepas de ZIKV que para las cepas de DENV-2 y YFV-17D.

Los resultados de los ensayos de infección muestran que en células HTR8 y en MØ-M2, ambos linajes de ZIKV son más eficientes en términos de infección y replicación. Siendo el linaje africano de Zika el que genera los títulos virales, porcentajes de infección y virus yield/célula más elevados. Estos resultados concuerdan con los reportados por Sheridan *et al.*, (2018), en trofoblastos diferenciados a partir de células madre embrionarias humanas y en células de coriocarcinoma humano, infectadas con diferentes cepas de ZIKV linaje africano (Uganda MR-766, Nigeria ib-H30656 y Senegal 41525-DAK) y asiático (México MexI-44, Camboya FSS13025 y Panamá PANcdc259249). Sus resultados demuestran que las cepas Uganda y Senegal son más virulentas y a la vez inducen títulos virales más elevados que las cepas asiáticas. En otro estudio realizado en mosquitos de la especie *Ae. aegypti* y en ratones adultos gestantes, se evidencia nuevamente la alta capacidad de transmisión, replicación y

virulencia de las cepas africanas de ZIKV en contraste con las cepas asiáticas (Aubry *et al.*, 2021).

Nuestros resultados en conjunto con otros estudios demuestran la alta tasa de replicación y virulencia de las cepas africanas y en especial de la cepa Uganda (MR-766) en comparación con las cepas asiáticas (Aubry *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2017; Sheridan *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2018; Tesla *et al.*, 2022). Por ello resulta paradójico que hasta la fecha los brotes humanos y malformaciones congénitas han sido adjudicadas solo al linaje asiático (Hill *et al.*, 2019; Jiolle *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2019; Musso *et al.*, 2019). Una posible explicación de este desconcertante fenómeno es que las cepas asiáticas se propagan más eficientemente en *Ae. aegypti* vector antropofílico por excelencia (Weger-Lucarelli *et al.*, 2016; Willard *et al.*, 2017), mientras que otra hipótesis menciona que las cepas africanas al ser más letales para el feto generan abortos tempranos, impidiendo el desarrollo fetal avanzado, siendo considerados como abortos espontáneos lo cual conlleva a un subregistro de la incidencia de infecciones por ZIKV africano (Sheridan *et al.*, 2018). Los factores maternos como deficiencias nutricionales, inmunodeficiencias y enfermedades hemodinámicas también se han asociado con mayor virulencia de ZIKV y la manifestación de SCZ (Dos Santos *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2019).

Los resultados aquí presentados indican que las células HTR8 son más permisivas a la replicación de las cepas de ZIKV en comparación con DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal), las razones pueden ser variadas y multifactoriales. No obstante, se podría especular sobre una habilidad intrínseca de ZIKV para manipular más eficientemente algunas vías de señalización orientadas a favorecer la replicación viral en estas células. La maquinaria mTOR es una vía de señalización celular conformada por dos complejos (mTORC1 y mTORC2) relacionados con la regulación de diversos procesos como crecimiento, proliferación, supervivencia, transcripción y traducción para la síntesis de proteínas, biogénesis de ribosomas y lípidos, autofagia y migración celular (Foster y Fingar, 2010; Laplante y Sabatini, 2009; Li *et al.*, 2014; Preuss *et al.*, 2013; Sarbassov *et al.*, 2005). Se ha reportado que esta vía es manipulada por varios virus de ARN incluidos ZIKV, DENV y YFV para promover su replicación y evadir respuesta inmune antiviral (Albentosa-González *et al.*, 2021; Chan *et al.*, 2018; Chiramel y Best, 2018; De O da Silva *et al.*, 2021; Gratton *et al.*, 2019; Kongt *et al.*, 2020; Sahoo *et al.*, 2020; Vidotto *et al.*, 2017).

Con base a nuestros resultados en los ensayos de infección, se podría especular que ZIKV modula la vía mTOR de forma más eficiente que DENV-2 y YFV-17D en las células HTR8 y por ello son más permisivas a su replicación. Para probar esta hipótesis, se evaluó la activación de los complejos mTORC1 y mTORC2 en células HTR8 infectadas con ZIKV (linajes africano y asiático), DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal) durante varios tiempos post infección (0, 2, 4, 6, 12, 24). El análisis de los Westerns blots indicó que las cuatro cepas virales inducen activación de ambas vías mTOR (**Figura 23 y 24**). Las cepas de ZIKV, en especial la cepa africana muestra una mayor y más rápida activación de ambas vías. Asimismo, el tratamiento de las células HTR8 con los fármacos inhibidores Rapamicina y AZD8055, previo a la infección con las diferentes cepas virales, resultó en una disminución de la expresión de la proteína viral NS3 y de los títulos virales en todas las condiciones de infección, pero nuevamente la mayor inhibición se observó en las infecciones con ZIKV (**Figura 26, 27C y 28**).

Los resultados obtenidos con DENV-2 en células HTR8 concuerdan con los reportados por Carter *et al.*, (2022) en células Huh7 y HepG2 donde demuestran que la infección por DENV induce activación de mTORC2 con la correspondiente inhibición de apoptosis y activación de NS5, lo cual favorece la replicación viral. No obstante, trabajos realizados en otras líneas celulares como HepG2 (Jordan y Randall, 2017; Sinha *et al.*, 2021), BHK-21 y neuroblastos de ratón (Kao *et al.*, 2018), HUVECs (Kong *et al.*, 2020) y en megacariocitos (Lahon *et al.*, 2021); refieren que la inhibición de la vía mTOR con fármacos y siRNAs favorece la replicación viral de dengue con el correspondiente incremento en los títulos virales, concluyendo que la infección modula negativamente la vía mTOR para inducir autofagia y lipofagia. En cuanto a la infección con YFV y la modulación de la maquinaria mTOR es escasa la información publicada; sin embargo, existe un trabajo realizado en células BHK-21, que concuerda con los resultados aquí presentados, y en el cual inhiben la maquinaria mTOR por medio del tratamiento con Sirolimus, induciendo una disminución de la replicación viral de YFV-17D en comparación con las células no tratadas (Vidotto *et al.*, 2017); se concluye además que la inhibición de la maquinaria mTOR induce una modulación negativa en la síntesis de cyclofilina A (CypA), una proteína que ha sido reportada como necesaria para la replicación de flavivirus por su interacción con la proteína viral NS4B (Ma *et al.*, 2021; Vidotto *et al.*, 2017; Xin *et al.*, 2021).

Nuestras observaciones en células HTR8 tratadas con rapamicina y AZD8055 e infectadas con las cepas de ZIKV, coinciden con lo reportado por Chan *et al.*, (2018), en células Huh-7 y células de neuroblastoma (U251 y SF268) tratadas con AR-12 (Celecoxib) un inhibidor de la actividad PI3K/AKT, que posteriormente fueron infectadas con cepas asiáticas y africanas de ZIKV; concluyendo que el inhibidor AR-12 podría ser una alternativa terapéutica contra este virus ya que afecta significativamente la progenie viral en ambos linajes de ZIKV. En otro trabajo publicado por Sahoo *et al.*, (2020), en células progenitoras neuronales (LUHMES), refieren que la infección de estas células con la cepa MR77 de ZIKV linaje africano induce activación de ambos complejos de la vía mTOR. Asimismo, la inhibición de ambas vías por tratamiento con drogas (Torin-1 y rapamicina) o silenciamiento (mTOR, Rictor y Raptor) resultó en una disminución significativa de la expresión de la proteína viral E y de la progenie viral, sin observar diferencias del efecto producido por la inhibición de mTORC1 o mTORC2. Los autores concluyen que la replicación de ZIKV requiere de la activación tanto de mTORC1 como mTORC2, induciendo una regulación negativa de la autofagia para facilitar la replicación viral. Finalmente, los resultados del trabajo publicado por Albentosa-González *et al.*, (2021), también concuerdan con los reportados para ZIKV en la presente investigación. Ellos trabajaron con células Huh-7 y Hek293T tratadas con inhibidores de AKT (MK-2206, Honokiol y Ipatasertib) y posteriormente infectadas con los flavivirus de Zika, Usutu y Oeste del Nilo. Sus resultados demuestran que la inhibición de AKT afecta significativamente la replicación viral de ZIKV y USUTV; además reportan que AKT interactúa con la polimerasa viral NS5 y que la afectación en la replicación viral se debe a la disminución de la fosforilación de NS5 mediada por la vía PI3K1/AKT.

Los datos presentados en esta investigación en concordancia con los publicados por otros investigadores (Albentosa-González *et al.*, 2021; Chan *et al.*, 2018; Sahoo *et al.*, 2020) demuestran que la infección por ZIKV en líneas celulares de origen embrionario, nervioso y de hígado induce una modulación positiva de la maquinaria mTOR, necesaria para favorecer su replicación viral. Sin embargo, un estudio realizado por Liang *et al.*, (2016), refiere que la infección por ZIKV induce una modulación negativa de la maquinaria mTOR a través de la interacción con las proteínas virales NS4A y NS4B, lo cual favorece una desregulación celular que conlleva a neurogénesis defectuosa y autofagia aberrante en células neuronales. No

obstante, en este trabajo no se refleja el efecto de la inhibición de la vía mTOR sobre la replicación de ZIKV en células neuronales.

Durante el ciclo de replicación de los flavivirus, la autofagia es un proceso clave que puede cumplir funciones pro y antivirales (Chiramel y Best, 2018). En la fase temprana de replicación es necesario el remodelamiento de la membrana del retículo endoplasmático para la formación de los paquetes vesiculares donde ocurre la replicación viral, este proceso es mediado por las proteínas NS4A y NS4B (Chatel-Chaix y Bartenschlager, 2018; Diosa-Toro *et al.*, 2020), y se ha relacionado con la modulación negativa de mTORC (Liang *et al.*, 2016). La formación de los paquetes vesiculares también conocidos como fabricas virales genera estrés en el RE el cual es directamente asociado con autofagia, siendo éste un proceso necesario para la replicación viral (Chiramel y Best., 2018; Gratton *et al.*, 2019; Viettri *et al.*, 2022). Sin embargo, luego de esta fase temprana de replicación es necesario que el proceso de autofagia se revierta para que la célula no entre en apoptosis, un conocido mecanismo de respuesta antiviral (Lewy *et al.*, 2017; Valadao *et al.*, 2016). En tal sentido, se hace coherente que la infección con flavivirus active la maquinaria mTOR para favorecer su replicación por medio de la inhibición de autofagia e inducción de procesos como supervivencia celular, biogénesis de ribosomas, síntesis de proteínas (Foster y Fingar, 2010; Laplante y Sabatini, 2009; Li *et al.*, 2014; Preuss *et al.*, 2013; Sarbassov *et al.*, 2005) y activación de NS5 mediada por PI3K/AKT (Albentosa-González *et al.*, 2021). Es claro que el proceso de autofagia modulado por la vía mTOR es necesario para la replicación de los flavivirus. No obstante, los mecanismos moleculares que determinan la regulación positiva o negativa de autofagia en las diferentes etapas del ciclo de replicación de flavivirus no se conocen por completo y parece depender, al menos en parte, del tipo de cultivo celular utilizado.

Diversos trabajos refieren la participación de la respuesta inmune innata en la transmisión vertical de ZIKV y el desarrollo de SCZ (Foo *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2019; Ngono *et al.*, 2018). En este estudio comparativo de infección también se evaluó el perfil de secreción de citocinas tanto en células HTR8 como en MØ-M2 infectados con los flavivirus antes mencionados a diferentes tiempos post infección (6, 24, 48 y 72 hpi). Los resultados obtenidos en células HTR8 indican que la infección con ZIKV induce una respuesta innata caracterizada por mayores concentraciones de IL-1 β , IL-6 y TNF α con baja respuesta de IL-10, CCL3, IP-10, VEGF e IFNs α /y (**Figura 29, Tabla 4**). Los perfiles de secreción sugieren

que en células citotrofoblásticas la infección con ZIKV modula negativamente la respuesta quimiotáctica y de interferones. Estos resultados coinciden con los reportados por Luo *et al.*, (2018) en la misma línea celular, donde la infección con ZIKV se diferenció del perfil observado en DENV-4 y YFV-17D por altos niveles de IL-6 y TNF α con valores bajos de CCL3 e IFNs α/β . En otro estudio de infección realizado en astrocitos de cerebro humano relacionaron la alta tasa de replicación viral de cepas tanto africanas como asiáticas de ZIKV directamente con una limitada respuesta de citocinas proinflamatorias y quimiotácticas (IL-6, IL-8, IL-12, CCL2, CCL-5, IP-10) (Stefanik *et al.*, 2018).

En células macrofágicas la respuesta innata fue más robusta que en células HTR8, con diferencias menos marcadas entre las cepas de ZIKV y las cepas de DENV-2 y YFV-17D (**Figura 30, Tabla 5**). La infección con ambos linajes de ZIKV se caracterizó por generar un perfil más proinflamatorio y quimiotáctico mediado por altos valores de IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL-2, CCL-3, CCL-7, CXCL8, IP-10 y VEGF. En relación con la respuesta mediada por IFNs α /y tal como se observó en células HTR8 las cepas de ZIKV inducen una baja respuesta antiviral en comparación con las cepas de DENV-2 y YFV-17D. Esta capacidad de ZIKV para modular negativamente la respuesta de interferón ya ha sido reportada por varios autores (Colavita *et al.*, 2018; Grant *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2019). Los resultados del perfil de citocinas obtenidos en esta investigación sugieren que el establecimiento de la infección por ZIKV en el estroma placentario está favorecido por la limitada respuesta inflamatoria, quimiotáctica y los bajos niveles de IFNs α /y inducidos en células citotrofoblásticas modulando positivamente su permisibilidad a la replicación de ZIKV. Asimismo, la baja respuesta a IFN tipo I y II en células macrofágicas, puede ser determinante en la propagación de ZIKV hasta la circulación fetal.

Finalmente, los resultados de esta investigación en conjunto sugieren que las células del CTB parecen tener una función de barrera que contiene la infección por DENV y YFV, la cual es franqueada por ZIKV permitiendo su activa replicación en el estroma placentario, infectando a las HBCs con la subsecuente propagación del virus a la circulación fetal. Esta habilidad de ZIKV, ausente en DENV y YFV, es favorecida por la sumatoria de un conjunto de factores como: i) mayor eficiencia de infección y replicación, ii) mejor capacidad de activación de la maquinaria mTOR y iii) limitada respuesta inflamatoria y quimiotáctica con baja actividad de IFNs.

IX. CONCLUSIONES

- Las células HTR8 son más permisivas a la infección y replicación de las cepas de ZIKV (linajes africano y asiático) que a la infección por DENV-2 y YFV-17 (cepa vacunal). Lo que sugiere que en modelos *in vivo* las células citotrofoblásticas cumplen una función de barrera que, si bien logra contener a DENV y YFV, es franqueada por ZIKV.
- El establecimiento de la infección por ZIKV en el estroma de las microvellosidades placentarias es favorecido por la sumatoria de varios factores: i) mayor eficiencia de infección y replicación, ii) mejor capacidad de activación de la maquinaria mTOR y iii) limitada respuesta inflamatoria y quimiotáctica con baja actividad de IFNs.
- En el estroma de las microvellosidades, la infección de las HBCs con ZIKV induce un perfil proinflamatorio con baja respuesta de IFNs α/β lo cual favorece el daño del endotelio de los capilares fetales y su infección, favoreciendo el ingreso del virus a la circulación fetal.

X. PERSPECTIVAS

- Dado el corto tiempo de infección (3 hpi) observado en los macrófagos, se plantea confirmar los resultados de las cinéticas de infección de los co-cultivos en platos Transwells®, tratando el filtro previamente con elementos de matriz extracelular antes de sembrar las células HTR8.
- Escalar los resultados obtenidos en células citotrofoblásticas en explantes de tejido placentario evaluando diferencias entre las cepas de ZIKV (linaje africano y asiático), DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal) en términos de eficiencia de infección.
- Debido a la ausencia del receptor DC-SIGN en la superficie de células HTR8, se plantea identificar en estas células los receptores reportados en la literatura que interactúan con la proteína E y evaluar su afinidad con las cepas de ZIKV (linaje africano y asiático), DENV-2 y YFV-17D (cepa vacunal).
- Dado que SCZ se ha asociado con neonatos de mujeres con carencias nutricionales, se evaluará en células HTR8 sometidas a estrés y a deficiencia de nutrientes la replicación viral, la activación de mTOR y el perfil de citocinas en un contexto de infección con ambos linajes de ZIKV.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertosa-González, L., Jimenez de Oya, N., Arias, A., Clemente-Casares, P., Martin-Acebes, M. Á., Saiz, J. C., Sabariego, R., & Mas, A. (2021). Akt Kinase Intervenes in Flavivirus Replication by Interacting with Viral Protein NS5. *Viruses*, 13(5), 896. <https://doi.org/10.3390/v13050896>
- Ander, S. E., Diamond, M. S., & Coyne, C. B. (2019). Immune responses at the maternal-fetal interface. *Science Immunology*, 4(31), eaat6114. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>
- Anfasa, F., Goeijenbier, M., Widagdo, W., Siegers, J. Y., Mumtaz, N., Okba, N., van Riel, D., Rockx, B., Koopmans, M. P. G., Meijers, J. C. M., & Martina, B. E. E. (2019). Zika Virus Infection Induces Elevation of Tissue Factor Production and Apoptosis on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Frontiers in Microbiology*, 10, 817. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00817>
- Apte-Sengupta, S., Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current Opinion in Virology*, 9, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.020>
- Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S., & Coyne, C. B. (2017). Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host & Microbe*, 21(5), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>
- Aubry, F., Jacobs, S., Darmuzey, M., Lequime, S., Delang, L., Fontaine, A., Jupatanakul, N., Miot, E. F., Dabo, S., Manet, C., Montagnetelli, X., Baidaliuk, A., Gámbaro, F., Simon-Lorière, E., Gilsoul, M., Romero-Vivas, C. M., Cao-Lormeau, V.-M., Jarman, R. G., Diagne, C. T., ... Lambrechts, L. (2021). Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nature Communications*, 12(1), 916. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21199-z>
- Bharucha, T., & Breuer, J. (2016). Review: A neglected Flavivirus: an update on Zika virus in 2016 and the future direction of research. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(4), 317–325. <https://doi.org/10.1111/nan.12326>
- Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., & Failloux, A.-B. (2018). An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*, 20 (11–12), 646–660. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
- Carrington, C. V. F., & Auguste, A. J. (2013). Evolutionary and ecological factors underlying the tempo and distribution of yellow fever virus activity. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 13, 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.015>
- Carter, C. C., Mast, F. D., Olivier, J. P., Bourgeois, N. M., Kaushansky, A., & Aitchison, J. D. (2022). Dengue activates mTORC2 signaling to counteract apoptosis and maximize viral replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 979996. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.979996>
- Chan, J. F.-W., Zhu, Z., Chu, H., Yuan, S., Chik, K. K.-H., Chan, C. C.-S., Poon, V. K.-M., Yip, C. C.-Y., Zhang, X., Tsang, J. O.-L., Zou, Z., Tee, K.-M., Shuai, H., Lu, G., & Yuen, K.-Y. (2018). The celecoxib derivative kinase inhibitor AR-12 (OSU-03012) inhibits Zika virus via down-regulation of the PI3K/Akt pathway and protects Zika virus-infected A129 mice: A host-targeting treatment strategy. *Antiviral Research*, 160, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.007>
- Chatel-Chaix, L., & Bartenschlager, R. (2014). Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: The enemy inside--caught in the web. *Journal of Virology*, 88(11), 5907–5911. <https://doi.org/10.1128/JVI.03404-13>

- Chiramel, A. I., & Best, S. M. (2018). Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Research*, 254, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.006>
- Chiu, C.-F., Chu, L.-W., Liao, I.-C., Simanjuntak, Y., Lin, Y.-L., Juan, C.-C., & Ping, Y.-H. (2020). The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the Blood-Brain Barrier. *Frontiers in Microbiology*, 11, 214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00214>
- Coelho, A. V. C., & Crovella, S. (2017). Microcephaly Prevalence in Infants Born to Zika Virus-Infected Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), E1714. <https://doi.org/10.3390/ijms18081714>
- Colavita, F., Bordoni, V., Caglioti, C., Biava, M., Castilletti, C., Bordi, L., Quartu, S., Iannetta, M., Ippolito, G., Agrati, C., Capobianchi, M. R., & Lalle, E. (2018). ZIKV Infection Induces an Inflammatory Response but Fails to Activate Types I, II, and III IFN Response in Human PBMC. *Mediators of Inflammation*, 2018, 2450540. <https://doi.org/10.1155/2018/2450540>
- Cordeiro, M. T., Pena, L. J., Brito, C. A., Gil, L. H., & Marques, E. T. (2016). Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet* (London, England), 387(10030), 1811–1812. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30253-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30253-7)
- Counotte, M. J., Kim, C. R., Wang, J., Bernstein, K., Deal, C. D., Broutet, N. J. N., & Low, N. (2018). Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLoS Medicine*, 15(7), e1002611. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002611>
- Coyne, C. B., & Lazear, H. M. (2016). Zika virus—Reigniting the TORCH. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(11), 707–715. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.125>
- Cross, J. C. (1998). Formation of the placenta and extraembryonic membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 857, 23–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10104>
- De Carvalho, N. S., De Carvalho, B. F., Fugaça, C. A., Dóris, B., & Biscaia, E. S. (2016). Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: A review of literature and Brazilian data. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 20(3), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.02.006>
- Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C., & Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor. *Science* (New York, N.Y.), 294(5544), 1102–1105. <https://doi.org/10.1126/science.1063518>
- De O da Silva, L. R., Oliveira, P., Sardi, S., Soares, G., Bandeira, A. C., Costa, R. D. S., Rafaels, N., Campbell, M., Brunetti, T., Crooks, K., Daya, M., Teixeira, M. G., Carneiro, V. L., Barnes, K., & Figueiredo, C. A. (2021). Zika Virus Congenital Syndrome and MTOR gene variants: Insights from a family of dizygotic twins. *Heliyon*, 7(4), e06878. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06878>
- Diosa-Toro, M., Prasanth, K. R., Bradrick, S. S., & Garcia Blanco, M. A. (2020). Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. *Virology Journal*, 17(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01329-7>
- Dixit, E., Boulant, S., Zhang, Y., Lee, A. S. Y., Odendall, C., Shum, B., Hacohen, N., Chen, Z. J., Whelan, S. P., Fransen, M., Nibert, M. L., Superti-Furga, G., & Kagan, J. C. (2010). Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*, 141(4), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.018>
- DGE, (2021). Dirección General de Epidemiología. Casos confirmados por laboratorio de Síndrome Congénito asociado a Zika, México 2016 – 2021. (Revisado: octubre 2022). Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/desglose-de-casos-de-sindrome-congenito-asociado-a-zika>
- 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)

- Dos Santos, S. F. M., Soares, F. V. M., de Abranches, A. D., da Costa, A. C. C., Gomes-Júnior, S. C. D. S., Fonseca, V. de M., & Moreira, M. E. L. (2019). Nutritional profile of newborns with microcephaly and factors associated with worse outcomes. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 74, e798. <https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e798>
- Driggers, R. W., Ho, C.-Y., Korhonen, E. M., Kuivanen, S., Jääskeläinen, A. J., Smura, T., Rosenberg, A., Hill, D. A., DeBiasi, R. L., Vezina, G., Timofeev, J., Rodriguez, F. J., Levanov, L., Razak, J., Iyengar, P., Hennenfent, A., Kennedy, R., Lanciotti, R., du Plessis, A., & Vapalahti, O. (2016). Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *The New England Journal of Medicine*, 374(22), 2142–2151. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601824>
- Fishburn, A. T., Pham, O. H., Kenaston, M. W., Beesabathuni, N. S., & Shah, P. S. (2022). Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 13, 847588. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.847588>
- Foo, S.-S., Chen, W., Chan, Y., Bowman, J. W., Chang, L.-C., Choi, Y., Yoo, J. S., Ge, J., Cheng, G., Bonnin, A., Nielsen-Saines, K., Brasil, P., & Jung, J. U. (2017). Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nature Microbiology*, 2(11), 1558–1570. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0016-3>
- Foster, K. G., &ingar, D. C. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): Conducting the cellular signaling symphony. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14071–14077. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.094003>
- Freitas, D. A., Souza-Santos, R., Carvalho, L. M. A., Barros, W. B., Neves, L. M., Brasil, P., & Wakimoto, M. D. (2020). Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PloS One*, 15(12), e0242367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>
- Gandolfo, C., Terrosi, C., Prathymnan, S., Anichini, G., Savellini, G. G., Morgante, G., & Cusi, M. G. (2022). Human Polymorphonuclear Cells Support Zika Virus to Cross Endothelial Monolayer and Access Bloodstream. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3), 321. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030321>
- García-Blanco, M. A., Vasudevan, S. G., Bradrick, S. S., & Nicchitta, C. (2016). Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Research*, 134, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.010>
- García, J. E. (2018). Estudio comparativo de la infección por virus Zika y fiebre amarilla en monocitos humanos y células de Hofbauer. [Trabajo de tesis de Maestría en Ciencias]. CINVESTAV-IPN.
- Goenaga, S., Fabbri, C., Dueñas, J. C. R., Gardenal, C. N., Rossi, G. C., Calderon, G., Morales, M. A., Garcia, J. B., Enria, D. A., & Levis, S. (2012). Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones province, Argentina. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12(11), 986–993. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0730>
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M. C., Sánchez-Seco, M. P., Evans, M. J., Best, S. M., & García-Sastre, A. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Gratton, R., Agrelli, A., Tricarico, P. M., Brandão, L., & Crovella, S. (2019). Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), E1048. <https://doi.org/10.3390/ijms20051048>
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 480–496. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.480>

- Hennessey, M., Fischer, M., & Staples, J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas—Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), 55–58. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e1>
- Higuera, A., & Ramírez, J.D. (2019). Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Tropica*, 190: 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010>
- Hill, S. C., Vasconcelos, J., Neto, Z., Jandondo, D., Zé-Zé, L., Aguiar, R. S., Xavier, J., Thézé, J., Mirandela, M., Micoló Cândido, A. L., Vaz, F., Sebastião, C. D. S., Wu, C.-H., Kraemer, M. U. G., Melo, A., Chamber-Reis, B. L. F., de Azevedo, G. S., Tanuri, A., Higa, L. M., ... Faria, N. R. (2019). Emergence of the Asian lineage of Zika virus in Angola: An outbreak investigation. *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(10), 1138–1147. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30293-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30293-2)
- Holbrook, M. R. (2017). Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses*, 9(5), E97. <https://doi.org/10.3390/v9050097>
- Huang, S., & Houghton, P. J. (2003). Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(4), 371–377. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(03\)00071-7](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(03)00071-7)
- Huang, Y.-J. S., Higgs, S., Horne, K. M., & Vanlandingham, D. L. (2014). Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses*, 6(11), 4703–4730. <https://doi.org/10.3390/v6114703>
- Jiolle, D., Moltini-Conclois, I., Obame-Nkoghe, J., Yangari, P., Porciani, A., Scheid, B., Kengne, P., Ayala, D., Failloux, A.-B., & Paupy, C. (2021). Experimental infections with Zika virus strains reveal high vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* populations from Gabon (Central Africa) for the African virus lineage. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 1244–1253. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1939167>
- Jordan, T. X., & Randall, G. (2017). Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis To Stimulate a Proviral Lipophagy. *Journal of Virology*, 91(11), e02020-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02020-16>
- Kao, J.-C., HuangFu, W.-C., Tsai, T.-T., Ho, M.-R., Jhan, M.-K., Shen, T.-J., Tseng, P.-C., Wang, Y.-T., & Lin, C.-F. (2018). The antiparasitic drug niclosamide inhibits dengue virus infection by interfering with endosomal acidification independent of mTOR. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(8), e0006715. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006715>
- Keller-Stanislawski, B., Englund, J. A., Kang, G., Mangtani, P., Neuzil, K., Nohynek, H., Pless, R., Lambach, P., & Zuber, P. (2014). Safety of immunization during pregnancy: A review of the evidence of selected inactivated and live attenuated vaccines. *Vaccine*, 32(52), 7057–7064. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.052>
- Koi, H., Zhang, J., & Parry, S. (2001). The mechanisms of placental viral infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 943, 148–156. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03798.x>
- Kong, W., Mao, J., Yang, Y., Yuan, J., Chen, J., Luo, Y., Lai, T., & Zuo, L. (2020). Mechanisms of mTOR and Autophagy in Human Endothelial Cell Infected with Dengue Virus-2. *Viral Immunology*, 33(1), 61–70. <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0009>
- Kumar, A., Hou, S., Airo, A. M., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W., Power, C., & Hobman, T. C. (2016). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Reports*, 17(12), 1766–1775. <https://doi.org/10.15252/embr.201642627>
- Lahon, A., Arya, R. P., & Banerjea, A. C. (2021). Dengue Virus Dysregulates Master Transcription Factors and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Megakaryocytes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 715208. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.715208>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). MTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 20), 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>

- Leach, L., & Firth, J. A. (1997). Structure and permeability of human placental microvasculature. *Microscopy Research and Technique*, 38(1–2), 137–144. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970701/15\)38:1/2<137::AID-JEMT14>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970701/15)38:1/2<137::AID-JEMT14>3.0.CO;2-Q)
- Lee, L. J., Komarasamy, T. V., Adnan, N. A. A., James, W., & RMT Balasubramaniam, V. (2021). Hide and Seek: The Interplay Between Zika Virus and the Host Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 12, 750365. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750365>
- Lewy, T. G., Grabowski, J. M., & Bloom, M. E. (2017). BiP: Master Regulator of the Unfolded Protein Response and Crucial Factor in Flavivirus Biology. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2), 291–300.
- Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). Rapamycin: One drug, many effects. *Cell Metabolism*, 19(3), 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59, 23–61. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59002-9)
- Liang, B., Guida, J. P., Costa Do Nascimento, M. L., & Mysorekar, I. U. (2019). Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome. *Virulence*, 10(1), 768–775. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1656503>
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S. A., Zlokovic, B. V., Zhao, Z., & Jung, J. U. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*, 19(5), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>
- Liu, Z.-Y., Shi, W.-F., & Qin, C.-F. (2019). The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(3), 131–139. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0134-9>
- Ma, Z., Zhang, W., Wu, Y., Zhang, M., Wang, L., Wang, Y., Wang, Y., & Liu, W. (2021). Cyclophilin A inhibits A549 cell oxidative stress and apoptosis by modulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Bioscience Reports*, 41(1), BSR20203219. <https://doi.org/10.1042/BSR20203219>
- Martínez Viedma, M. D. P., & Pickett, B. E. (2018). Characterizing the Different Effects of Zika Virus Infection in Placenta and Microglia Cells. *Viruses*, 10(11), E649. <https://doi.org/10.3390/v10110649>
- McConkey, C. A., Delorme-Axford, E., Nickerson, C. A., Kim, K. S., Sadovsky, Y., Boyle, J. P., & Coyne, C. B. (2016). A three-dimensional culture system recapitulates placental syncytiotrophoblast development and microbial resistance. *Science Advances*, 2(3), e1501462. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501462>
- Miranda, J., Martín-Tapia, D., Valdespino-Vázquez, Y., Alarcón, L., Espejel-Nuñez, A., Guzmán-Huerta, M., Muñoz-Medina, J. E., Shibayama, M., Chávez-Munguía, B., Estrada-Gutiérrez, G., Lievano, S., Ludert, J. E., & González-Mariscal, L. (2019). Syncytiotrophoblast of Placentae from Women with Zika Virus Infection Has Altered Tight Junction Protein Expression and Increased Paracellular Permeability. *Cells*, 8(10), E1174. <https://doi.org/10.3390/cells8101174>
- Muller, D. A., Depelsenaire, A. C. I., & Young, P. R. (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl_2), S89–S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487–524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
- Musso, D., Ko, A. I., & Baud, D. (2019). Zika Virus Infection—After the Pandemic. *The New England Journal of Medicine*, 381(15), 1444–1457. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1808246>

- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Shan Yan, A., Cao-Lormeau, V. M., & Broult, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 19(14), 20761. <https://doi.org/10.2807/15607917.es2014.19.14.20761>
- Ngono, A. E., & Shresta, S. (2018). Immune Response to Dengue and Zika. *Annual Review of Immunology*, 36, 279–308. <https://doi.org/10.1146/annurevimmunol-042617-053142>
- Noronha, L. de, Zanluca, C., Azevedo, M. L. V., Luz, K. G., & Santos, C. N. D. D. (2016). Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(5), 287–293. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160085>
- Odendall, C., Dixit, E., Stavru, F., Bierne, H., Franz, K. M., Durbin, A. F., Boulant, S., Gehrke, L., Cossart, P., & Kagan, J. C. (2014). Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nature Immunology*, 15(8), 717–726. <https://doi.org/10.1038/ni.2915>
- Oliveira, L. G., & Perón, J. P. S. (2019). Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(3), 695–701. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1808246>
- PAHO, (2022). Topics of Zika virus. Julio 07 de 2022. Disponible online: <https://www.paho.org/en/topics/zika>
- Payne, A. F., Binduga-Gajewska, I., Kauffman, E. B., & Kramer, L. D. (2006). Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. *Journal of Virological Methods*, 134(1–2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.003>
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature Microbiology*, 5(6), 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Pinto Junior, V. L., Luz, K., Parreira, R., & Ferrinho, P. (2015). [Zika Virus: A Review to Clinicians]. *Acta Medica Portuguesa*, 28(6), 760–765. PMID:26849762.
- Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1185–1192. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>
- Possas, C. (2016). Zika: What we do and do not know based on the experiences of Brazil. *Epidemiology and Health*, 38, e2016023. <https://doi.org/10.4178/epih.e2016023>
- Preuss, E., Hugle, M., Reimann, R., Schlecht, M., & Fulda, S. (2013). Pan-mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor AZD8055 primes rhabdomyosarcoma cells for ABT-737-induced apoptosis by down-regulating Mcl-1 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35287–35296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495986>
- Puerta-Guardo, H., Mosso, C., Medina, F., Liprandi, F., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2010). Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 2), 394–403. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015420-0>
- 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>
- Rasband, W.S., ImageJ, J., (1997). U.S. National institutes of health. Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., & Petersen, L. R. (2016). Zika Virus and Birth Defects—Reviewing the Evidence for Causality. *The New England Journal of Medicine*, 374(20), 1981–1987. <https://doi.org/10.1056/NEJMsr1604338>
- Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., & Strauss, J. H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and

evolution. *Science* (New York, N.Y.), 229(4715), 726–733.

<https://doi.org/10.1126/science.4023707>

- Rios, F. J., Touyz, R. M., & Montezano, A. C. (2017). Isolation and Differentiation of Human Macrophages. En R. M. Touyz & E. L. Schiffrin (Eds.), *Hypertension: Methods and Protocols* (pp. 311–320). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6625-7_24
- Robbins, J. R., Skrzypczynska, K. M., Zeldovich, V. B., Kapidzic, M., & Bakardjiev, A. I. (2010). Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000732. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000732>
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *CMLS*, 67(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Rosenberg, A. Z., Yu, W., Hill, D. A., Reyes, C. A., & Schwartz, D. A. (2017). Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(1), 43–48. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0401-OA>
- Sager, G., Gabaglio, S., Sztul, E., & Belov, G. A. (2018). Role of Host Cell Secretory Machinery in Zika Virus Life Cycle. *Viruses*, 10(10), E559. <https://doi.org/10.3390/v10100559>
- Sahoo, B. R., Pattnaik, A., Annamalai, A. S., Franco, R., & Pattnaik, A. K. (2020). Mechanistic Target of Rapamycin Signaling Activation Antagonizes Autophagy To Facilitate Zika Virus Replication. *Journal of Virology*, 94(22), e01575-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01575-20>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* (New York, N.Y.), 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Sinha, M., Chakraborty, U., Kool, A., Chakravarti, M., Das, S., Ghosh, S., Thakur, L., Khuranna, A., Nayak, D., Basu, B., Kar, S., Ray, R., & Das, S. (2022). In-vitro antiviral action of *Eupatorium perfoliatum* against dengue virus infection: Modulation of mTOR signaling and autophagy. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114627. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114627>
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 32, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schreiber, K. H., Arriola Apelo, S. I., Yu, D., Brinkman, J. A., Velarde, M. C., Syed, F. A., Liao, C.-Y., Baar, E. L., Carbajal, K. A., Sherman, D. S., Ortiz, D., Brunauer, R., Yang, S. E., Tzannis, S. T., Kennedy, B. K., & Lamming, D. W. (2019). A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo. *Nature Communications*, 10(1), 3194. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11174-0>
- Shao, Q., Herrlinger, S., Zhu, Y.-N., Yang, M., Goodfellow, F., Stice, S. L., Qi, X.-P., Brindley, M. A., & Chen, J.-F. (2017). The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development* (Cambridge, England), 144(22), 4114–4124. <https://doi.org/10.1242/dev.156752>
- Sheridan, M. A., Balaraman, V., Schust, D. J., Ezashi, T., Roberts, R. M., & Franz, A. W. E. (2018). African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. *PloS One*, 13(7), e0200086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200086>
- SINAVE/DGE/SS. (2021). Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus Zika. Secretaria de Salud, Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección

General de Epidemiología. (Revisado: octubre 2022). Disponible *online*:

<https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2021>

- Smith, D. R., Sprague, T. R., Hollidge, B. S., Valdez, S. M., Padilla, S. L., Bellanca, S. A., Golden, J. W., Coyne, S. R., Kulesh, D. A., Miller, L. J., Haddock, A. D., Koehler, J. W., Gromowski, G. D., Jarman, R. G., Alera, M. T. P., Yoon, I.-K., Buathong, R., Lowen, R. G., Kane, C. D., ... Nasar, F. (2018). African and Asian Zika Virus Isolates Display Phenotypic Differences Both In Vitro and In Vivo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(2), 432–444. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0685>
- Staun-Ram, E., & Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 3, 56. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-56>
- Stefanik, M., Formanova, P., Bily, T., Vancova, M., Eyer, L., Palus, M., Salat, J., Braconi, C. T., Zanotto, P. M. de A., Gould, E. A., & Ruzek, D. (2018). Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neuroscience*, 19(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0407-2>
- Suzano, C. E. S., Amaral, E., Sato, H. K., Papaiordanou, P. M., & Campinas Group on Yellow Fever Immunization during Pregnancy. (2006). The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil. *Vaccine*, 24(9), 1421–1426. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.033>
- Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Harris, E., & Pereira, L. (2018). Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants From First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(8), 1202–1213. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix552>
- Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., Harris, E., & Pereira, L. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell host & microbe*, 20(2), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.002>
- Tang, Z., Tadesse, S., Norwitz, E., Mor, G., Abrahams, V. M., & Guller, S. (2011). Isolation of hofbauer cells from human term placentas with high yield and purity. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 66(4), 336–348. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01006.x>
- Tesla, B., Powers, J. S., Barnes, Y., Lakhani, S., Acciani, M. D., & Brindley, M. A. (2022). Temperate Conditions Limit Zika Virus Genome Replication. *Journal of Virology*, 96(10), e0016522. <https://doi.org/10.1128/jvi.00165-22>
- Valadão, A. L. C., Aguiar, R. S., & de Arruda, L. B. (2016). Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01233>
- Vidotto, A., Morais, A. T. S., Ribeiro, M. R., Pacca, C. C., Terzian, A. C. B., Gil, L. H. V. G., Mohana-Borges, R., Gallay, P., & Nogueira, M. L. (2017). Systems Biology Reveals NS4B-Cyclophilin A Interaction: A New Target to Inhibit YFV Replication. *Journal of Proteome Research*, 16(4), 1542–1555. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00933>
- Viettri, M., Rodríguez-León, F., Zambrano, J. L., & Ludert, J. E. (2022). La replicación del virus del dengue induce respuestas de estrés en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi, tanto en células de vertebrados como de invertebrados (mosquitos). *Universitas Medica*, 63(3), Article 3. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed63-3.deng>
- Weger-Lucarelli, J., Rückert, C., Chotiwan, N., Nguyen, C., Luna, S. M. G., Fauver, J. R., Foy, B. D., Perera, R., Black, W. C., Kading, R. C., & Ebel, G. D. (2016). Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(10), e0005101. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005101>

- WHO, (2019). Yellow fever key facts. Mayo 07 de 2019. Disponible *online*: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>
- WHO, (2022). Dengue and severe dengue. Enero 10 de 2022. Disponible *online*: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Willard, K. A., Demakovsky, L., Tesla, B., Goodfellow, F. T., Stice, S. L., Murdock, C. C., & Brindley, M. A. (2017). Zika Virus Exhibits Lineage-Specific Phenotypes in Cell Culture, in *Aedes aegypti* Mosquitoes, and in an Embryo Model. *Viruses*, 9(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/v9120383>
- Wong, C. P., Xu, Z., Hou, S., Limonta, D., Kumar, A., Power, C., & Hobman, T. C. (2019). Interplay between Zika Virus and Peroxisomes during Infection. *Cells*, 8(7), E725. <https://doi.org/10.3390/cells8070725>
- Xin, S., Liu, L., Li, Y., Yang, J., Zuo, L., Cao, P., Yan, Q., Li, S., Yang, L., Cui, T., & Lu, J. (2022). Cyclophilin A binds to AKT1 and facilitates the tumorigenicity of Epstein-Barr virus by mediating the activation of AKT/mTOR/NF- κ B positive feedback loop. *Virologica Sinica*, S1995-820X(22)00149-3. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.09.001>
- Xiong, Y.-Q., Mo, Y., Shi, T.-L., Zhu, L., & Chen, Q. (2017). Dengue virus infection during pregnancy increased the risk of adverse fetal outcomes? An updated meta-analysis. *Journal of Clinical Virology*, 94, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.008>
- Zhang, L., Shen, Z.-L., Feng, Y., Li, D.-Q., Zhang, N.-N., Deng, Y.-Q., Qi, X.-P., Sun, X.-M., Dai, J.-J., Yang, C.-G., Yang, Z.-F., Qin, C.-F., & Xia, X.-S. (2019). Infectivity of Zika virus on primary cells support tree shrew as animal model. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 232–241. <https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1559707>
- Zhou, H., Luo, Y., & Huang, S. (2010). Updates of mTOR inhibitors. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(7), 571–581. <https://doi.org/10.2174/187152010793498663>

XII. ANEXOS

12.1. Lista de abreviaturas.

Ae: *Aedes*.

AKT: RAC-Alpha Serina/Treonina proteína cinasa.

C: cápside.

CD14: antígeno de diferenciación de monocitos (clúster de diferenciación 14).

CD163: receptor scavenger rico en cisteína / receptor scavenger de hemoglobina.

CTBs: citotrofoblastos.

DC-SIGN: molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas.

DENV: virus de dengue.

DENV-2: virus del dengue, serotipo 2.

Deptor: Proteína con dominio DEP que interactúa con mTOR.

E: proteína de envoltura.

EMEM: medio esencial mínimo de Eagle.

FSC-A: forward scatter.

HBCs: células de Hofbauer o macrófagos placentarios.

hpi: horas post infección.

HTR8: trofoblastos de placenta humana del primer trimestre de gestación.

IF: inmunofluorescencia.

IFNs: interferones.

IFN λ : interferón Lambda tipo III.

IFN γ : interferón Gamma tipo II.

IFNs: interferones.

IFN λ : interferón Lambda tipo III.

IFN γ : interferón Gamma tipo II.

IFN α : interferón Alpha tipo I.

IL-10: interleucina 10.

IL-15: interleucina 15.

IL-1 β : interleucina 1 Beta.

IL-6: interleucina 6.

IL-8 /CXCL8: interleucina 8 / motivo ligando quimiocina 8.

IP-10 /CXCL10: proteína 10 inductora de IFN γ / motivo ligando quimiocina 10.

M: membrana.

Mab: monoclonal antibody (anticuerpo monoclonal).

MCP1 /CCL2: proteína 1 quimioatrayente de monocitos / motivo ligando quimiocina 2.

MCP3 /CCL7: proteína 3 quimioatrayente de monocitos / motivo ligando quimiocina 7.

M-CSF: factor estimulante de colonia de macrófagos.

MIP-1 α /CCL3: proteína inflamatoria de macrófagos 1 Alpha / motivo ligando quimiocina 3.

μ m: micras.

μ g: microgramo.

μ L: microlitro.

mL: mililitro.

MOI: multiplicidad de infección.

MØ-M2: macrófagos fenotipo M2.

mTOR: *mammalian Target of Rapamycin* (blanco mecanístico de Rapamicina en mamíferos).

mTORC1: blanco mecanístico de Rapamicina en mamíferos complejo 1.

mTORC2: blanco mecanístico de Rapamicina en mamíferos complejo 2.

nm: nanómetro.

NS: proteína no estructural.

NS3: proteína no estructural 3.

NS4A: proteína no estructural 4 dominio A.

NS4B: proteína no estructural 4 dominio B.

NS5: proteína no estructural 5

PBS: tampón fosfato salino.

PFM: paraformaldehído.

pg: picogramos.

PI3K: proteína fosfatidilinoisitol 3 cinasa.

PMA: Phorbol-12-miristato-13-acetato.

prM: precursor de membrana.

Raptor: proteína asociada a la regulación de mTOR.

RE: retículo endoplasmático.

Rictor: compañero de mTOR insensible a rapamicina.

S6K1: proteína ribosomal S6 cinasa 1.

SCZ: síndrome congénito asociado a virus Zika.

SFB: suero fetal bovino.

siRNA: *small interfering RNA* (RNA pequeño de interferencia).

SSC-A: side scatter.

STAT2: proteína 2 transductor de señal y de activación de la transcripción.

STBs: sincitiotrofoblastos.

TA: temperatura ambiente.

TNF α : factor de necrosis tumoral Alpha.

TORCH: Toxoplasmosis, Otros, Rubeola, CMV y HIV.

UFF/mL: unidades formadoras de focos por mililitro.

VE6: células Vero-E6.

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular.

WB: *Western blot*.

YFV: virus de la fiebre amarilla.

YFV-17D: virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal.

ZIKV: virus de Zika.

ZIKV-MEX: virus de Zika, asilado mexicano linaje asiático.

ZIKV-MR77: virus de Zika, cepa Uganda linaje africano.

12.2 Aprobación del proyecto de colaboración con el INPer



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Ciudad de México, 15 de enero 2018.

Dra. Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez
Directora de Investigación
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

Estimada Dra. Estrada

Por este medio hago constar que acepto colaborar como co-Investigador en el proyecto titulado "Estudio comparativo de la infección de células de Hofbauer con virus del zika, virus del dengue y la cepa vacunal de fiebre amarilla 17D", con número de registro INPer: 2017-3-134 el cual será desarrollado durante el periodo comprendido del 21 de diciembre 2017, al 11 de diciembre del 2019.

Atentamente,

Dr. Juan Ernesto Ludert
Profesor
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular
Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)
Ciudad de México
Correo electrónico: jludert@cinvestav.mx

CINVESTAV
DEPARTAMENTO DE
INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR
C.A. 601910

12.3 Consentimiento informado para la donación de placentas humanas

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Ciudad de México a ___ de _____ del 2017

CONSENTIMIENTO INFORMADO: DONACIÓN DE PLACENTA HUMANA PARA INVESTIGACIÓN.

Propósito de la investigación:

El propósito de la investigación es únicamente aislar y cultivar células placentarias para ser estudiadas en el laboratorio. No se realizarán experimentos para obtener datos genéticos personalizados de la donante. Ni la placenta, ni ninguno de los componentes que de esta se obtengan, se utilizarán para obtener algún beneficio económico para los investigadores involucrados en el proyecto.

Riesgos:

Esta recolección de muestra no representa ningún riesgo para la salud suya o de su bebé, ya que la placenta se obtendrá después del parto normal o de la operación cesárea.

Procedimientos: No se realizará ningún procedimiento a la donadora.

Consentimiento

Yo _____ de _____ años de edad, entrego en donación de forma voluntaria y sin ninguna presión o inducción mi placenta con fines de investigación, la cual se obtendrá después de que se realizará _____ (parto o cesárea), mismo que yo autorice.

Se me ha explicado que:

La utilización de la muestra será exclusivamente para fines de investigación, será manejada de forma confidencial y anónima, respetando las normas de manejo de residuos peligrosos biológicos infecciosos y los desechos generados serán destruidos respetando estas normas.

Autorizo en pleno uso de mis facultades, se me ha informado de manera detallada el uso final de la muestra. Entiendo que mi identidad será resguardada con estricta confidencialidad. Manifiesto que estoy satisfecha con la información recibida del médico y consiento la donación para que mi placenta sea utilizada con los propósitos señalados.

Comprendo y he recibido la información que solicite para aclarar mis dudas.

ACEPTO al médico _____ para que obtenga la muestra de placenta y realice los procedimientos antes descritos.

Investigador responsable: Dr. Juan Ernesto Ludert León, CINVESTAV-IPN. Tel. 55-57473800, ext.5610.

Nombre y firma del paciente

Testigo

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

12.4 Productos científicos

- **Viettri, M.**, Caraballo, G.I., Sanchez, M.E., Espejel-Nuñez, A., Betanzos, A., Ortiz-Navarrete, V., Estrada-Gutiérrez, G., Nava, P. & Ludert, J.E. (2022). Cytotrophoblast cells play a role in favoring Zika virus invasion to the placental stroma while deterring dengue and yellow fever vaccine viruses. Enviado: 07 noviembre, 2022, Journal Infectious Diseases.
- **Viettri, M.**, León, F. R., Zambrano, J. L., & Ludert, J. E. (2022). La replicación del virus del dengue induce respuestas de estrés en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi, tanto en células de vertebrados como de invertebrados (mosquitos). *Universitas Medica*, 63(3), Art. 3. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed63-3.deng>.
- Caraballo, G. I., Rosales, R., **Viettri, M.**, Castillo, J. M., Cruz, R., Ding, S., Greenberg, H. B., & Ludert, J. E. (2022). The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Interacts with the Putative Epigenetic Regulator DIDO1 to Promote Flavivirus Replication in Mosquito Cells. *Journal of Virology*, 96(12), e0070422. <https://doi.org/10.1128/jvi.00704-22>.
- Rubio-Miranda, J. Á., Cázares-Raga, F. E., Coy-Arechavaleta, A. S., **Viettri, M.**, Cortes-Martínez, L., Lagunes-Guillén, A., Chávez-Munguía, B., Ludert, J. E., & Hernández-Hernández, F. de la C. (2022). Septin 2 interacts with dengue virus replication complex proteins and participates in virus replication in mosquito cells. *Virology*, 570, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.03.007>.
- **Viettri, M.**, Zambrano, J. L., Rosales, R., Caraballo, G. I., Gutiérrez-Escolano, A. L., & Ludert, J. E. (2021). Flavivirus infections induce a Golgi stress response in vertebrate and mosquito cells. *Scientific Reports*, 11(1), 23489. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02929-1>.