



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Modulación de la vía SOCS/RhoA en células gliales de ratón CD1
durante la infección por virus Zika”**

TESIS

Que presenta

BIOL. JOSE DE JESUS BRAVO SILVA

Para obtener el grado

MAESTRO EN CIENCIAS

Directora de la Tesis:

DRA. ROSA MARÍA DEL ANGEL NÚÑEZ DE CÁCERES

Ciudad de México

JULIO, 2023

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y todos mis logros a futuro a mis padres **Lorena** y **Jose**, padres ejemplares y buenos. Gracias por su apoyo, amor y ser siempre su prioridad. Gracias a ustedes soy quien soy y puedo convertirme en lo que quiero ser. Siempre tendrán mi reconocimiento y respeto. Espero siempre apoyarlos como ustedes lo han hecho conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos del lab 8. Queda claro que no pude llegar a un mejor laboratorio como lo es el laboratorio 8 de virología. Gracias a **Carlos Daniel Cordero Rivera**, **Jonathan Hernández Castillo** y **Marcos Pérez García** y **Selvin Noé Palacios Rápalo** por su apoyo y todo lo que me enseñaron y ofrecirme su amistad. También agradezco a **Ricardo Jiménez Camacho** uno de mis mejor amigos dentro y fuera del laboratorio. A **Carlos Noe Farfán Morales** mi sensei y mejor amigo, gracias por apoyarme en todos mis proyectos y dejarme pensar por mí mismo, también gracias por aterrizar mis ideas por muy locas que fueran, sin tu chispa este proyecto no sería lo que es. A **Magda Lizbeth Benítez Vega**, mi persona especial, tú has influido tanto en mi vida personal como profesional y has hecho que pueda ser mucho mejor cada vez más, gracias por tu apoyo y por siempre estar ahí para mí y deseo que siempre este en mi vida.

A mis amigos que conocí durante mi camino en el Cinvestav. A Carlos Almazán y Mónica Vizcarra, gracias su apoyo desde mis primeros días en el Cinvestav y gracias por estar siempre ahí para mí.

A mi directora de tesis Dra. Rosa Ma. del Ángel. Gracias por creer en mí y por permitirme proponer y llegar con una idea al laboratorio, sin su confianza no podría haber llevado a cabo este trabajo.

A CONACyT. Gracias a CONACyT por otorgarme una beca para llevar a cabo mi estudio de maestría, sin ese apoyo no hubiera sido posible este proyecto.

Finalmente y no menos importante a todo el personal administrativo del centro, especialmente a **Clara Castelan**, al auxiliar **Fernando Medina** y al técnico **Jaimito** huestes están detrás de todos nuestros proyectos,

Francis Crick: “Tú, tus recuerdos y ambiciones, no son más que el comportamiento de un vasto ensamblaje de neuronas y sus moléculas”.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Epidemiología	7
3.1 Manifestaciones clínicas y patológicas de la infección	8
3.2 Transmisión del ZIKV.....	9
3.3 Estructura del virión	10
3.4 Ciclo replicativo del ZIKV	11
3.5 Tropismo del ZIKV	13
4. ANTECEDENTES	15
4.1 Mecanismo de replicación viral en tejido cerebral de ZIKV.....	15
4.2 Familia de GTPasas de Rho.....	16
4.3 Activadores de la familia Rho	16
4.4 Relación de GTPasas en la alteración de citoesqueleto durante la infección por ZIKV	17
4.5 Participación de RhoA en la respuesta proinflamatoria	20
4.6 Relación de genes SOCS y RhoA en la respuesta antiinflamatoria en el cerebro.....	22
5. JUSTIFICACIÓN	23
6. HIPÓTESIS	23
9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
10.1 Interactoma de las proteínas Vav y Rho.....	25
10.2 Cultivo primario enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1 25	
10.3 Propagación del virus y obtención de cerebros completos.....	25
10.4 Caracterización de cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1	26
10.5 Infección cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1 26	
10.6 Western Blot.....	27

10.7	Modulación e inhibición de RhoA	28
10.8	Evaluación de respuesta antiinflamatoria y proinflamatoria.....	28
10.9	Evaluación de la expresión de genes <i>socs</i> y <i>rhoa</i>	29
10.10	Estadística.....	29
11.	RESULTADOS.....	30
11.1	Evaluación <i>in silico</i> de la interacción de la proteína VAV3, comparada en ratón y humano.....	30
11.2	. Estandarización de cultivo primario y evaluación del cultivo enriquecido con microglía y astrocitos de ratones CD1	31
	32
11.3	Células del cultivo primario de ratón CD1 representan un buen modelo para el estudio de neuroinfección por ZIKV	32
11.4	La infección por ZIKV incrementa la expresión del RNAm y los niveles de proteína de SOCS1/3 en cerebros de ratones CD1	34
11.5	La infección por ZIKV incrementa la expresión del RNAm y los niveles de proteína de SOCS1/3 en cultivos primarios enriquecidos con microglía.....	36
11.6	La infección por ZIKV incrementa los niveles de RhoA en cerebros de ratón y en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro de ratón CD1	38
9.7	La modulación de los niveles endógenos totales RhoA puede estar relacionada con IRF-3 y NF-κB en la respuesta inmune proinflamatoria en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1	40
11.7	La modulación de niveles endógenos totales de RhoA no es dependiente de la proteína Vav3 en cerebros y en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1	41
11.8	Los fármacos hipolipemiantes modulan la vía de RhoA en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1	42
11.9	La modulación de la vía de RhoA reduce la infección de ZIKV en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1	44
12.	DISCUSIÓN	46
13.	CONCLUSIÓN	52
14.	BIBLIOGRAFÍA	53

1. RESUMEN

El virus Zika (ZIKV) pertenece a la familia *Flaviviridae* que incluye al género *Flavivirus*, el cual agrupa virus como fiebre amarilla, dengue y fiebre del Nilo Occidental. Según la Organización Panamericana de la Salud, durante el 2022 se registraron 24,689 casos en el continente americano. Sin embargo, a pesar de la importancia médica de las infecciones causadas por flavivirus, hasta el día de hoy no existe una vacuna eficaz que pueda combatir a este virus, por lo que el estudio de la patogénesis molecular del ZIKV es de suma importancia para la creación de antivirales y el diseño de vacunas.

El ZIKV tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune innata en el cerebro e intervenir en distintos procesos de señalización celular. Se ha reportado que los genes supresores de citocinas (SOCS) se ven incrementados durante esta infección en células progenitoras neuronales humanas (hNPCs). Además, el silenciamiento de estos genes disminuye la replicación viral. Asimismo, los genes SOCS se han asociado con la activación de la vía de RhoA, que a su vez está relacionada con la regulación del perfil proinflamatorio y antiinflamatorio en el cerebro. Sin embargo, poco se sabe de la relación de esta vía y alteraciones en el cerebro durante la infección por ZIKV. Los resultados de este estudio demuestran que la activación de la vía de RhoA es importante en algún punto de la infección por ZIKV, por lo que la descripción de este mecanismo podría contribuir en la comprensión de los procesos moleculares de la neurodegeneración y la respuesta inmune en cerebro durante la infección por ZIKV.

2. ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) belongs to the *Flaviviridae* family, which includes the genus *Flavivirus*, which groups viruses such as yellow fever, dengue, and West Nile fever.

According to the Pan American Health Organization, 24,689 cases were reported in the Americas in 2022. However, despite the medical importance of infections caused by flaviviruses, there is no effective vaccine that can combat this virus, so the study of the molecular pathogenesis of ZIKV is of utmost importance to create antivirals and design vaccines. ZIKV can evade the innate immune response in the brain and intervene in different cell signaling processes. It has been reported that cytokine suppressor genes (SOCS) are upregulated during this infection in human neuronal neural progenitor cells (hNPCs). Furthermore, silencing of these genes decreases viral replication.

Likewise, SOCS genes have been associated with RhoA activation, which in turn is related to the regulation of the proinflammatory and anti-inflammatory profile in the brain. However, little is known about the relationship of this pathway during ZIKV infection. The results of this study demonstrate that activation of the RhoA pathway is essential during ZIKV infection, and the description of this mechanism could contribute to understanding the molecular processes of neurodegeneration and the immune response in the brain during ZIKV infection.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Epidemiología

El virus Zika (ZIKV) pertenece a la familia *Flaviviridae* que incluye al género *Flavivirus*, el cual agrupa virus como fiebre amarilla, dengue y fiebre del Nilo Occidental. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante el 2022 se registraron 24,689 casos de infección por ZIKV en la región. Sin embargo, a pesar de la importancia médica de las infecciones causadas por flavivirus, hasta el día de hoy no existe una vacuna eficaz que pueda combatir a este virus, por lo que el estudio de la patogénesis molecular del ZIKV es de suma importancia para la creación de antivirales y el diseño de vacunas (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

El ZIKV fue aislado por primera vez en zonas boscosas de Uganda, África; este primer brote reportó 108 casos confirmados y 72 sospechosos (sin fallecimientos). Desde su descubrimiento ha generado brotes en el continente africano y asiático. La primera epidemia relacionada con el virus ocurrió en la isla de Yap en 2007, en donde el 75% de la población resultó afectada (WHO, 2022).

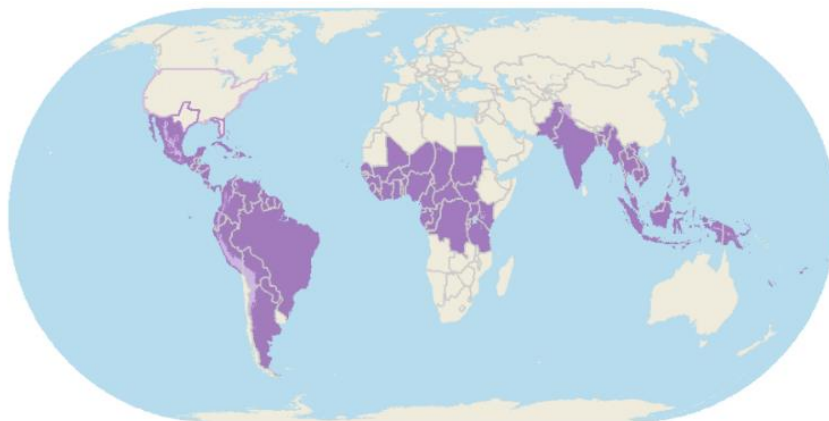


Figura 1. Áreas con mayor riesgo por ZIKV. En color morado se representan las zonas con alto riesgo de infección.

La primera aparición del virus en el continente americano se dio en la isla de Pascua en Chile entre el 13 marzo 2014 en esa isla. Casi un año más tarde en mayo de 2015 Brasil confirmó la transmisión del virus en el país (Figura 2), además de asociarlo al síndrome de Guillain-Barré y alteración en el SNC en neonatos. Tras estos brotes se ha identificado miles de casos del virus dentro del continente americano (Figura 2).

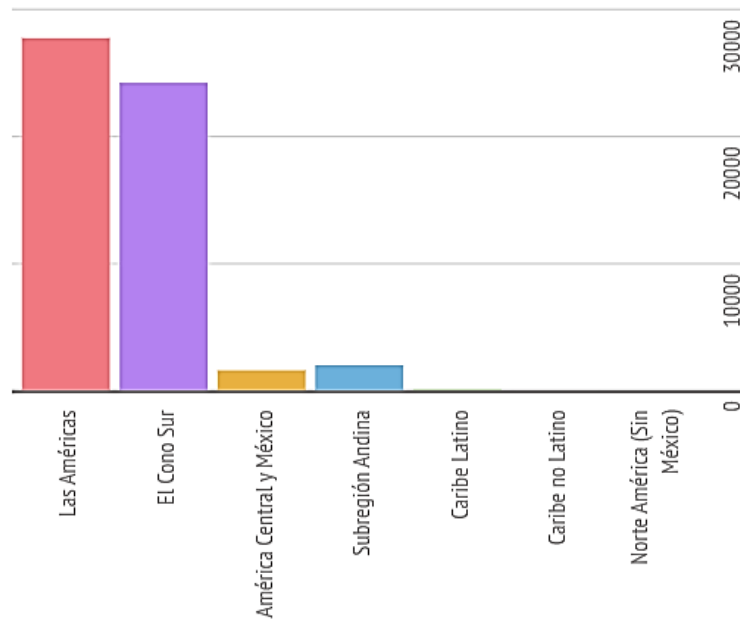


Figura 2. Brotes registrados por la Organización Panamericana de la Salud durante 2019 en distintas regiones del continente americano.

México se encuentra dentro de las áreas con mayor riesgo de contagio por ZIKV (Figura 1). Datos reportados por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por ZIKV (SINAVE) del 2015 al 2022 registraron 13,003 casos autóctonos, de los cuales 7,152 casos fueron de mujeres embarazadas.

3.1 Manifestaciones clínicas y patológicas de la infección

El ZIKV es un virus neurotrópico que se ha asociado a defectos congénitos debido a que altera la diferenciación de células neuronales, provocando trastornos neurológicos como la microcefalia en recién nacidos, y síndrome de

Guillain-Barre en adultos, motivo por el cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la infección por ZIKV como una emergencia de salud pública de importancia internacional (Cao-Lormeau et al., 2016).

Aunque se ha reportado la transmisión transplacentaria, el mecanismo por el cual el virus atraviesa al espacio intrauterino sigue siendo materia de estudio. Se sabe que ZIKV es capaz de infectar en primera instancia a las células endoteliales, fibroblastos, trofoblasto y macrófagos fetales (macrófagos de Hofbauer), estas dos últimas, importantes para la llegada del virus al feto (Cao et al., 2017). Actualmente, no existe clasificación que permita distinguir entre aquellas células con capacidad replicativa de aquellas que funcionan como reservorio, aunque se sabe que la infección del tejido placentario es importante para provocar alteraciones en el desarrollo de cerebro fetal, al permitir el cruce placentario del virus al cerebro de la gestante (Martinez Viedma & Pickett, 2018).

Al llegar al cerebro fetal, el ZIKV infecta células progenitoras neuronales, con capacidad de diferenciarse a neuronas, y células gliales. En el modelo de ratón, se ha reportado la infección de las células progenitoras microgliales y su participación como reservorio viral en el cerebro (Xu et al., 2020). La infección de las células progenitoras neuronales en etapas tempranas de la gestación puede provocar el Síndrome Congénito de Zika (CZS) (O da Silva et al., 2021), generando problemas oculares y de neurodesarrollo en neonatos.

3.2 Transmisión del ZIKV

Como muchos de los miembros de la familia de *Flaviviridae*, su principal transmisión está dada por artrópodos infectados, específicamente del género *Aedes spp.*, presente actualmente en zonas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Shankar et al., 2017).

Por otra parte, a diferencia del resto de *Flavivirus*, el ZIKV puede ser transmitido mediante el contacto sexual, representando el 3% de los casos confirmados

(Figura 3). En 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) demostró la transmisión vertical del ZIKV y su asociación con manifestaciones congénitas como microcefalia en neonatos y abortos en gestantes, principalmente cuando la madre estuvo infectada durante la gestación (Swaminathan et al., 2016 World Health Organization. ([WHO] 2016).

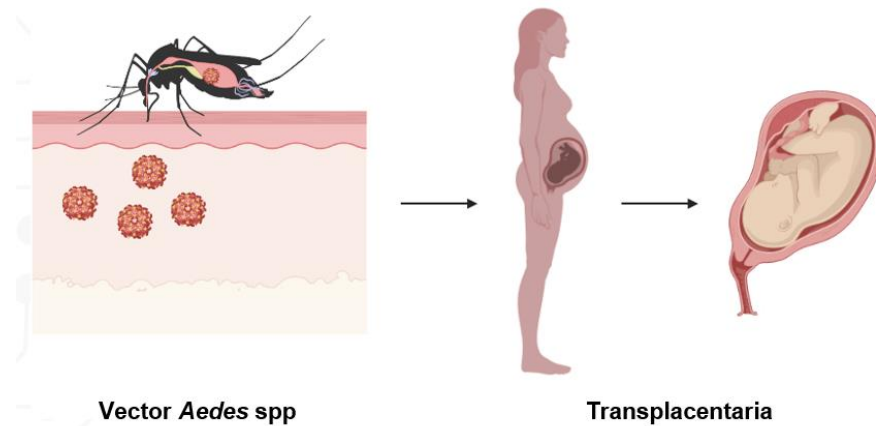


Figura 3. Principales formas de transmisión del ZIKV, desde la picadura del mosquito infectado, el cruce de la placenta y finalmente la llegada al cerebro fetal

3.3 Estructura del virión

Los miembros de esta familia se caracterizan por ser virus envueltos por una bicapa lipídica, con un tamaño aproximadamente de 40-60 nm, cuya nucleocápside resguarda un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva (Figura 4) que codifica para una poliproteína la cuál es procesada por proteasas virales y celulares en el retículo endoplásmico de la célula blanco, generando tres proteínas estructurales (C, Pre-M y E) y siete no estructurales llamadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Simmonds et al., 2017). El ZIKV es transmitido por vectores del género *Aedes* spp, aunque también se puede transmitir por contacto sexual, fómites y sangre contaminada (Baud et al., 2017; Tamura et al., 2019).

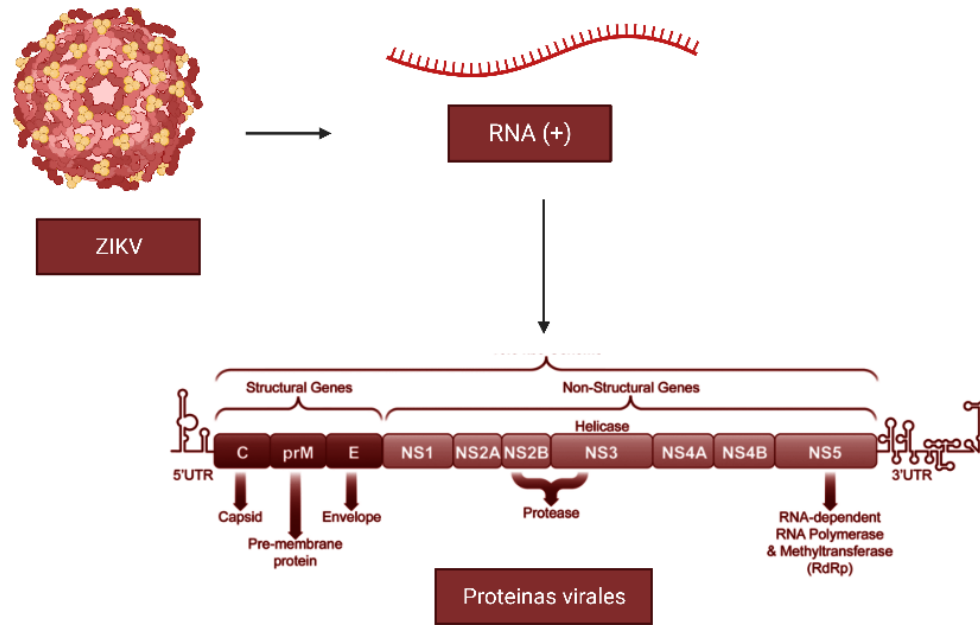


Figura 4. Proteínas virales y organización del genoma del ZIKV.

3.4 Ciclo replicativo del ZIKV

En general el ciclo replicativo no difiere del resto del grupo de los *flavivirus* (Figura 5). comienza cuando el virus se une a las células mediante receptores de superficie, algunos de los más utilizados son AXL, TAM y TIM1 siendo órgano dependiente. Esta unión permite la internalización de la partícula viral vía endosoma, y la fusión del virus con la membrana del endosoma se desencadena por su acidificación, comenzando con la modificación de la glicoproteína E del virus, que expone su región hidrofílica (péptido de fusión), permitiendo su unión a la membrana endosomal y liberando el genoma al citoplasma de la célula (Rodríguez et al., 2019).

Cuando el genoma está en el citoplasma es traducido en una poliproteína que es escindida por proteínas virales y celulares, dando origen a todas las proteínas (Nobrega et al., 2020; Nowakowski et al., 2016).

Dos de las proteínas no estructurales del virus presentan una actividad enzimática. 1) La NS3, una serina proteasa (tipo tripsina) que también presenta actividad de helicasa, importante para la replicación viral realizada por otra proteína no estructural con características enzimáticas. 2) La NS5 polimerasa dependiente de RNA la cual está encargada principalmente de replicar el genoma del virus (Bollati et al., 2010). Estas características replicativas le permiten remodelar múltiples zonas de las células como el retículo endoplasmático (RE), el núcleo y la membrana. Particularmente, en el RE, dónde se forman los sitios de replicación del virus, que permite a la replicación del genoma y la traducción de las proteínas, además del ensamblaje del particular inmaduras, y donde se generan invaginaciones de la membrana de RE. Las partículas virales inmaduras salen del RE y son exportadas al aparato de Golgi, a través de la Red Trans de Golgi (TGN) para ser sometidas a la escisión de la proteína prM por la proteasa celular furrina, lo que promueve la maduración y liberación de viriones maduros (Bhatnagar et al., 2017; Rodriguez et al., 2019).

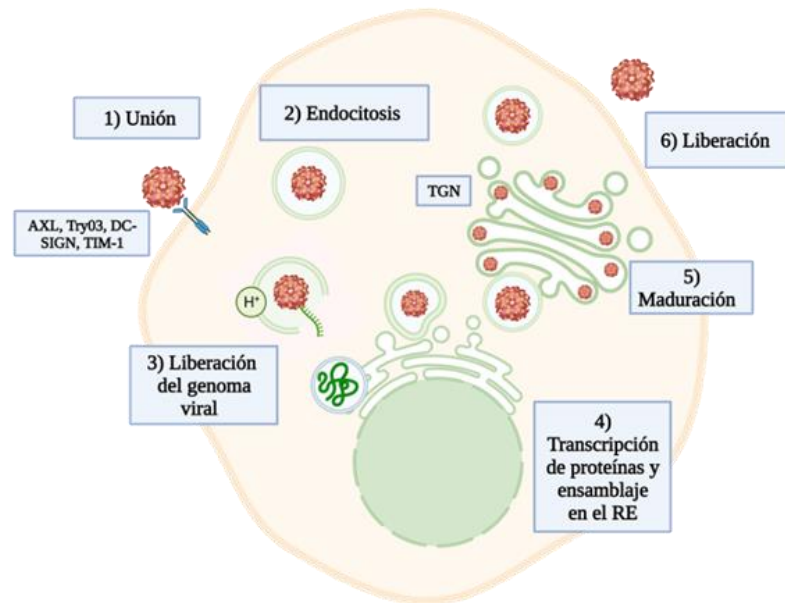


Figura 5. Ciclo replicativo del ZIKV donde se muestran los principales receptores de unión, la replicación y la liberación de viriones.

3.5 Tropismo del ZIKV

El ZIKV tiene la capacidad de infectar múltiples tejidos y células blanco, esto le permite estar presente en varios órganos causando un sinnúmero de alteraciones en la célula huésped.

Aunque no se sabe cuál es el receptor canónico del ZIKV, se ha reportado que el receptor AXL, miembro de la familia de receptores TAM (tirosina cinasa) presente principalmente en células progenitoras neuronales, gliales y neuronas, es utilizado por el virus para su entrada a la célula. Este receptor tiene la capacidad de interactuar con las proteínas de unión a fosfatidilserina Gas6 y Proteína S, siendo moléculas entre la superficie del virus y la célula. A su vez, se sabe que al inhibir el receptor AXL, el virus es capaz de seguir infectando las células gliales, demostrado que no es indispensable para la entrada del virus (Meertens et al., 2017; Nowakowski et al., 2016).

La infección del tejido cerebral (Figura 6) causa degeneración y muerte de las células del Sistema Nervioso Central (SNC), siendo el cerebro su principal órgano blanco, provocando defectos congénitos como microcefalia y síndromes de Guillain-Barré (dos Santos et al., 2016; Oehler et al., 2014).

Otros de los receptores importantes para el virus son TAM y TIM1, que consiste en glicoproteínas que pueden interactuar con la fosfatidilserina de la membrana viral. Estos receptores están expresados ampliamente en distintos tipos celulares placentarios humanos, mismos que son susceptibles a la infección por ZIKV (Nobrega et al., 2020).

La relación del ZIKV con sus principales receptores está dada por su capacidad de evadir la respuesta inmune, generando muerte y problemas en la diferenciación celular, esto en múltiples órganos como el tracto genital femenino, sitios inmunoprivilegiados como el ojo, el cerebro y los testículos. A su vez, se han encontrado partículas virales infecciosas en fluidos como el semen, la saliva, las lágrimas y la orina.

Principalmente durante la infección de tejidos maternos y fetales, como los macrófagos placentarios (células de Hofbauer), el trofoblasto y las células endoteliales son los principales sitios replicativos por el ZIKV, siendo esta una característica distintiva dentro del grupo de los *flavivirus* (Brasil et al., 2016; Murray et al., 2017; Swaminathan et al., 2016).

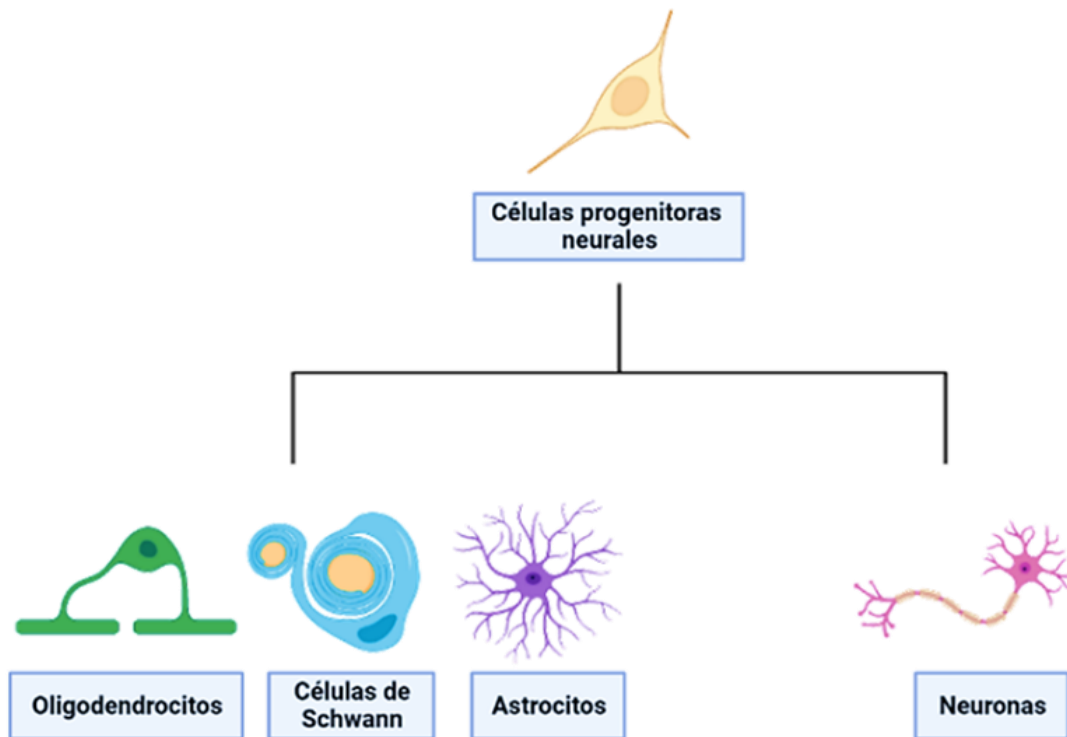


Figura 6. Tropismo celular de ZIKV. Las células progenitoras neurales pueden dar origen a diversas estirpes neuronales, como la microglía y las neuronas.

4. ANTECEDENTES

4.1 Mecanismo de replicación viral en tejido cerebral de ZIKV

En las últimas décadas, se han dilucidado algunos de los mecanismos moleculares detrás de las alteraciones y la patogenicidad causada por ZIKV en células del tejido cerebral. Específicamente, se ha descrito que la infección por ZIKV puede causar alteraciones en la señalización celular (Faizan et al., 2016), relacionada con la supervivencia, el crecimiento, la apoptosis y el transporte núcleo-citoplasma, en distintos tipos celulares (Liang et al., 2016; Xu et al., 2020; De Jesús-González et al., 2022).

Una de las vías mejor caracterizadas en cerebro durante las infecciones por ZIKV es la de mTOR, en donde las proteínas no estructurales NS4A y NS4B pueden inhibir la autofagia y desregular la neurogénesis y otros procesos importantes para el desarrollo del SNC en gestantes sanas, impidiendo la correcta diferenciación neuronal (Liang et al., 2016).

Recientemente, se ha sugerido la modulación de esta vía a través de la activación y/o inactivación de la vía de Vav/RhoA durante la infección por ZIKV. La proteína RhoA pertenece a la superfamilia de GTPasas de Rho, mismas que son activadas mediante receptores de superficie. Su activación e inactivación están dadas por la unión a GTP y GDP respectivamente, siendo los Factores de Intercambio de Guanina (GEF) los encargados del cambio de GDP a GTP (Song et al., 2015).

Por otra parte, ZIKV está relacionado con la deslocalización de proteínas como p-TBK1, importante para la mitosis, la respuesta inmune y la muerte de células gliales, mediante un mecanismo de transporte de la proteína p-TBK1 del citoplasma centrosomas al interior de las mitocondrias (Onorati et al., 2016).

4.2 Familia de GTPasas de Rho

Las GTPasas poseen un dominio G (Figura 7), mismo que cuenta con cinco motivos (G1–G5) conservados de aminoácidos, en donde ocurre el cambio de GTP o GDP. El motivo G1, es un loop de fosforilación y es responsable de la unión de nucleótidos de guanidina y Mg^{2+} . Los motivos G4-G5 pueden unirse a la base de guanina, subunidades Inhibidoras de la Disociación de Guanosina (GDI), mediante sus extremos N- y C-terminales, permitiendo alternar entre el estado activado e inactivado y la localización celular (Hodge & Ridley, 2016). mientras que los motivos G2-G3 participan como switch I/II manteniendo la unión de las subunidades Inhibidoras de la GDI, mediante sus extremos N- y C-terminales, permitiendo alternar entre el estado activado e inactivado y la localización celular (Hodge & Ridley, 2016).

Cuando las GTPasas están unidas a la subunidad GDI se mantienen en el citosol de la célula. Se ha reportado que la fosforilación de las GTPasas en la Tyr42 por parte de Src, puede promover la disociación de GDI y el intercambio por GTP por parte de un GEF, movilizándolo a RhoA hacia la membrana, estableciendo el contacto con proteínas efectoras, como ROCK (Proteína quinasa asociada a Rho) (Kim et al., 2018; Reichova et al., 2018).

4.3 Activadores de la familia Rho

Algunas GEF como las proteínas Vav están presentes en el SNC (Figura 8), principalmente Vav2 y Vav3 en el cerebro fetal. Estas proteínas se activan mediante la señalización de un receptor tirosina cinasa (Bustelo, 2014; Norbury et al., 2022). Las Vav se activan mediante la fosforilación en Tyr174 y a su vez pueden activar a GTPasas como RhoA mediante la interacción con su sitio Tyr42, permitiendo la activación de la vía (Song et al., 2015). Se ha descrito que las proteínas Vav y RhoA están implicadas en la regulación del desarrollo de las células progenitoras neuronales y en la estabilización del citoesqueleto en neuronas diferenciadas (August et al., 1994; Reichova et al., 2018). Además, esta vía interviene en cambios fenotípicos de la microglía

mediante la activación de la vía SOCS (Suppressor of cytokine signaling), implicada en la regulación de citocinas. La expresión de SOCS1 resulta en la degradación de las proteínas Vav vía proteasoma, mediante su interacción con el dominio SH2, conduciéndolas a ubiquitinación (Sepulveda et al., 2000).

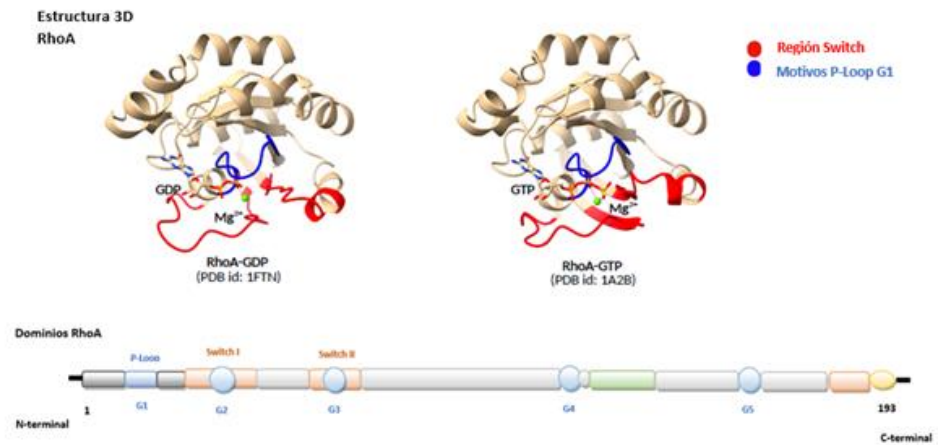


Figura 7. Estructura y dominios de RhoA. En color rojo se muestran las regiones Switch en donde se unen las subunidades GDI. En color azul se muestran los motivos característicos de las GTPasas. Tomado de Schmidt et al., (2022).

4.4 Relación de GTPasas en la alteración de citoesqueleto durante la infección por ZIKV

Previamente se ha descrito la participación de algunas GTPasas como RhoB y RhoG, en la entrada del virus ZIKA en las líneas celular A549 (epitelio alveolar basal) y SNB-19 (glioblastoma) (Luu et al., 2021).

Según datos reportados por Cortese et al., 2017, utilizando las cepas de ZIKV africana (MR766) y asiática (H/PF/2013), encontraron un reordenamiento de filamentos intermedios y microtúbulos durante la infección, además, se encontró un alteración en la morfología del núcleo de las células Huh7, mismo que presentaba una forma parecida a un riñón o “arriñonamiento” (Figura 9).

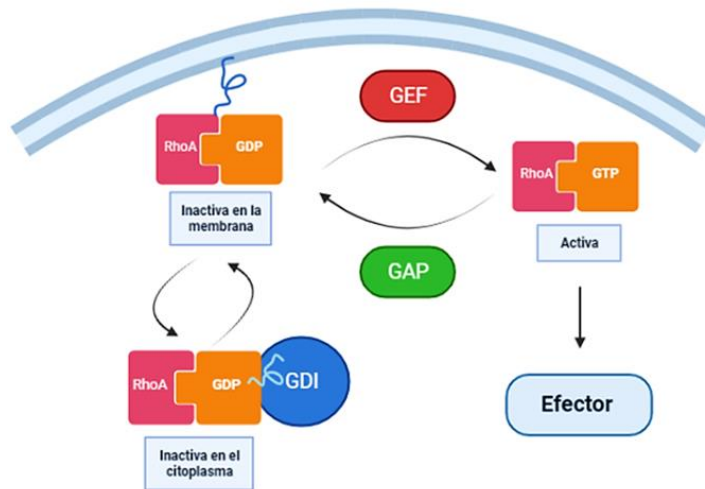


Figura 8. Vía de señalización de RhoA en sus estados de inactivación y activación.

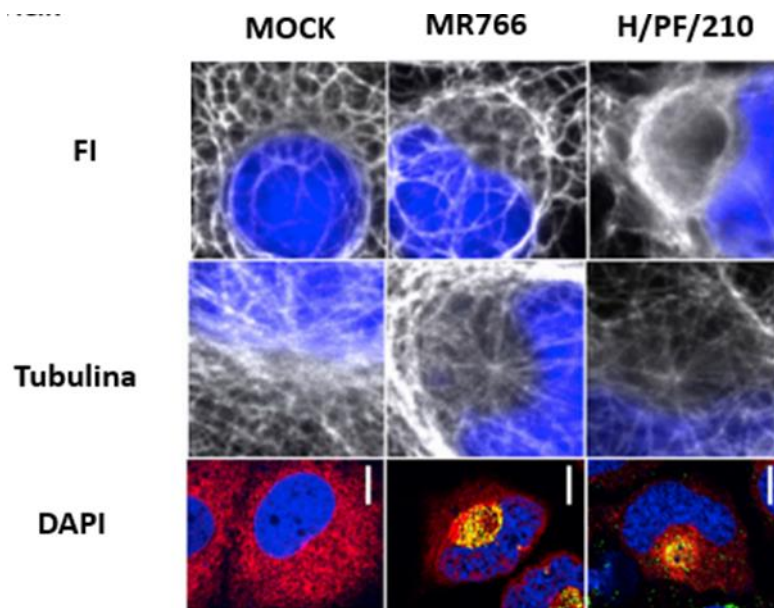


Figura 9. Células Huh-7. Las imágenes muestran un reordenamiento de los filamentos intermedios y tubulinas, además del "arriñonamiento" del núcleo durante la infección por ZIKV. Tomado de Cortese et al., 2017.

Estas modificaciones en el citoesqueleto inducida por la infección del ZIKV pueden estar relacionadas al daño en el neurodesarrollo que ocurre en

neonatos en donde las madres se infectaron durante la etapa gestacional. Por otra parte, se ha reportado la alteración en el citoesqueleto de actina, principalmente relacionada con la proteína estructural de envoltura (E) del virus, ya que al ser transfectada en células de testículo de ratón (SCB), se genera un reordenamiento del citoesqueleto de actina (Figura 10). Además se ha demostrado un decremento de la proteína ZO-1 durante la progresión de la infección lo cual ocurre también después de trasfectar a la proteína E, sugiriendo que este reordenamiento es un paso importante para que el virus pueda atravesar la barrera hemato-testicular e infectar órganos inmunoprivilegiados como los testículos (Nie et al., 2021)

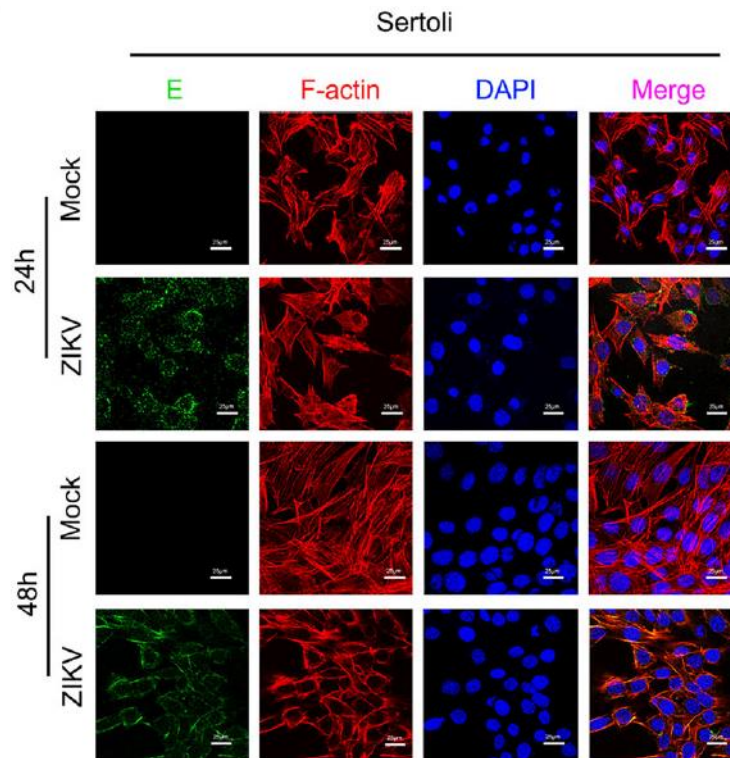


Figura 10. Inmunofluorescencia que muestra el cambio en citoesqueleto de actina en células SCB durante la infección por ZIKV a 24 y 48hr post infección. Tomada de Nie et al., 2021.

Así mismo, la importancia de las GTPasas de Rho también se ha visto relacionada con la entrada de algunos virus, como el de la Encefalitis japonesa, el de la estomatitis vesicular, el de la inmunodeficiencia humana

(VIH) y el del Ébola, en los que se ha observado un aumento y cambio en la localización de algunas GTPasas como RhoA, RhoB, RhoC, cdc42 y Rac1, que participan principalmente en mecanismos de entrada relacionados con el reacomodo del citoesqueleto y el transporte por endocitosis (Quinn et al., 2009; Kalia et al., 2013). La participación de las GTPasas en el caso de la entrada de otros *flavivirus* como ZIKV y DENV es incierta.

4.5 Participación de RhoA en la respuesta proinflamatoria

Se ha descrito que la inhibición de ROCK en células de la microglía está relacionada con el cambio o alteración en los estados fenotípicos inflamatorio M1 y antiinflamatorio M2. Aunque existen estudios contradictorios, se ha sugerido que la activación de ROCK favorece al fenotipo M1 (Ding et al., 2010; Bustelo, 2014; Guo et al., 2022). Se ha demostrado que en sujetos sanos las células de la microglía están en un estado de patrullaje, pero el contacto con estímulos como lipopolisacáridos o traumatismos, son capaces de conducir a un fenotipo M1, expresando citocinas y quimiocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 y subfamilia CCL2, así como marcadores de superficie CD11a, CD11b, CD36, CD45 y CD47 (Colonna & Butovsky, 2017). Por otro lado, el fenotipo M2 se caracteriza por poseer procesos antiinflamatorios y de remodelación, expresando moléculas como IL-10, IL-13, IL-14, TGF- β , IGF-1, FGF y CSF, además de marcadores como CD206 (Tang & Le, 2016).

La vía de señalización de las GTPasas se ha ligado a múltiples procesos entre ellos (Figura 11) la activación de múltiples proteínas de la respuesta inmune inflamatoria como Factor Regulador de Interferón-3 (IRF-3), en donde se ha reportado que la activación de Rac1 y PAK1 están relacionados con la activación en infecciones virales de IRF-3, para montar la respuesta a Interferón (IFN), mientras que la inhibición de Rac1 provoca una pobre respuesta de IFN- $\alpha\beta$, aun que la activación de IRF-3 en este caso aún no ha sido estudiada (Ehrhardt et al., 2004). En la infección por el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler, usado como modelo experimental para

esclerosis múltiple causada por virus, se ha reportado la que la inhibición de GTPasas como Ran por proteínas del virus, tiene la capacidad aunque no directa de alterar el transporte de RNAm, entre ellos de IRF-3, provocando una disminución de la respuesta antiviral (Ricour et al., 2009).

Por otra parte se ha sugerido la participación de RhoA/ROCK en la activación de otras vías importantes para la respuesta inmune, como lo es NF- κ B, en modelos experimentales de neuropatía diabética, en donde la activación de RhoA/ROCK está relacionada con la regulación de la vía de señalización, provocando la traslocación nuclear de NF- κ B, permitiendo la señalización y transcripción de genes proinflamatorios (Xie et al., 2013). A su vez, en otras GTPasas como Ral, la regulación de la Ciclina D1 activa a NF- κ B, donde se induce la activación de las vías de mitógenos y de supervivencia en fibroblastos (Henry et al., 2000).

En este sentido, la infección por ZIKV podría inducir un cambio de fenotipo M1 o M2 a través de la modulación de la vía Vav/RhoA/ROCK; sin embargo, poco se sabe respecto a las alteraciones de esta vía durante la infección.

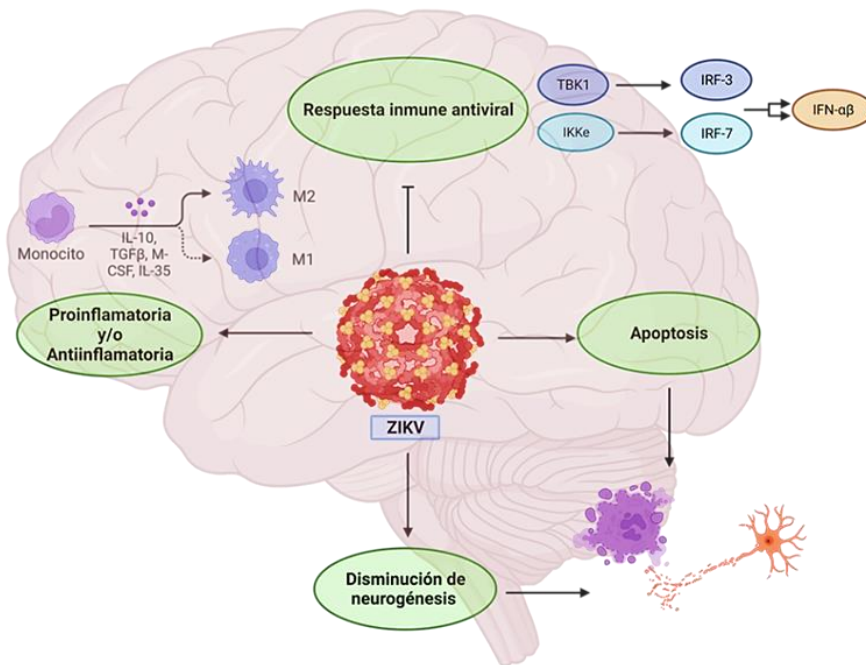


Figura 11. Principales vías de señalización alteradas durante la infección por ZIKV en el cerebro.

4.6 Relación de genes SOCS y RhoA en la respuesta antiinflamatoria en el cerebro

Se ha descrito que ZIKV tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune innata al aumentar la expresión de los genes SOCS1/3 en células inmunes como microglía/macrófagos. Mediante silenciamiento de estos genes se ha podido demostrar su importancia en la replicación viral (Foo et al., 2017; Seong et al., 2020). Esta sobreexpresión de SOCS1 sugiere la degradación de las proteínas Vav y la alteración de la vía de RhoA a causa de la infección.

Por el contrario, la entrada del ZIKV mediante el receptor tirosina cinasa AXL, responsable de la infección de la microglía y neuronas en el SNC (Meertens et al., 2017), podría activar esta vía a través de las Vav. Cabe señalar que la vía Vav/RhoA al poseer la capacidad de intervenir en múltiples procesos celulares, podía estar jugando un papel importante en la respuesta inmune antiinflamatoria (Ding et al., 2010).

5. JUSTIFICACIÓN

El ZIKV tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune innata en el cerebro e intervenir en distintos procesos de señalización celular para su replicación eficiente. Se ha reportado que los genes supresores de citocinas (SOCS) se ven incrementados durante esta infección en células progenitoras neuronales humanas (hNPCs), lo cual concuerda con el hecho de que su silenciamiento inhibe la replicación viral.

Los genes SOCS se han asociado con la activación de RhoA, que a su vez está relacionada con la regulación del perfil proinflamatorio y antiinflamatorio en cerebro. Sin embargo, poco se sabe de la relación de esta vía durante la infección por ZIKV. Por lo que el estudio de la expresión de los genes SOCS y su relación con la vía RhoA durante la infección por ZIKV, podría contribuir en la comprensión de los mecanismos moleculares de la neurodegeneración y la respuesta inmune en cerebro durante.

6. HIPÓTESIS

La infección de ZIKV en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro de ratón CD1 provoca el aumento de los genes SOCS1/3, y generar la activación de la vía de señalización de RhoA

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la vía de señalización SOCS/RhoA durante la infección con el ZIKV en tejido cerebral y cultivos enriquecidos con microglía de cerebro de ratón CD1.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar *in silico* las proteínas que participan en la activación de RhoA en ratón (*Mus musculus*) CD1 y en humanos

2. Evaluar la expresión de SOCS1/3 en tejido cerebral y en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1 durante la infección por ZIKV
3. Estudiar la vía de señalización RhoA en tejido cerebral y cultivos enriquecidos con microglía de cerebro de ratón CD1 durante la infección por ZIKV

9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

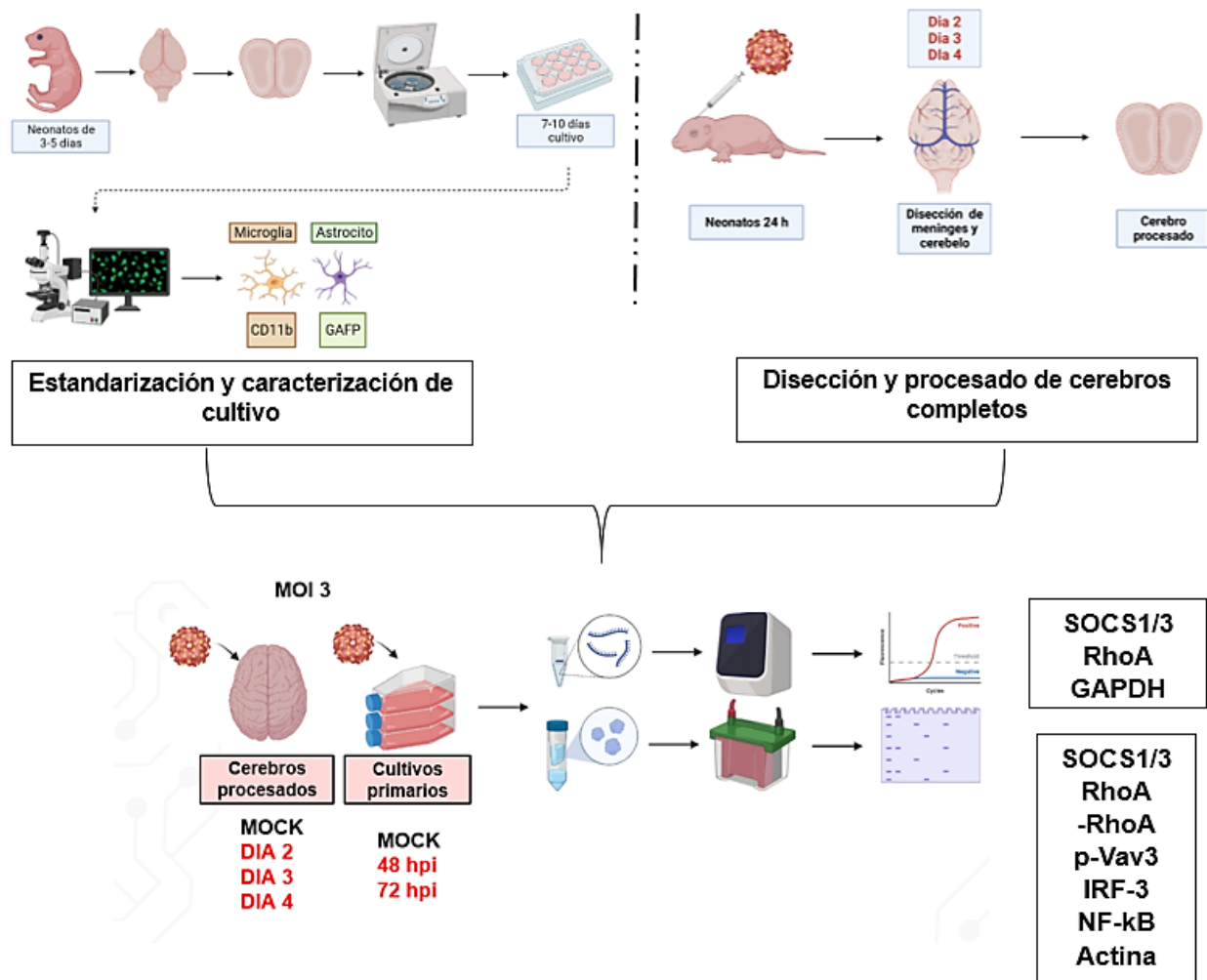


Figura 12. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Interactoma de las proteínas Vav y Rho

Para evaluar las proteínas de la familia de GTPasas Rho que pueden interactuar con Vav3, se realizaron una serie de interactomas del genoma de *Mus musculus* en la plataforma STRING (<https://string-db.org/>) y se compararon con el interactoma de las proteínas de humano, lo que permitió mostrar la correlación y participación de proteínas en común.

10.2 Cultivo primario enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1

Se utilizaron cerebros de ratones CD1 (*Mus musculus*) neonatos de 1 a 5 días obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Cinvestav) con numero de protocolo 035-19 y apegados a la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el manejo de animales de laboratorio.

Los ratones fueron llevados a eutanasia por el método de decapitación para obtener los cerebros. Posteriormente, fueron retiradas las meninges y el cerebelo, para evitar contaminación de otros tipos celulares. Se extrajeron las células de la microglía y astrocitos. El cultivo celular se realizó de acuerdo con lo descrito por Bronstein et al., 2013. Las células fueron crecidas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) a 37°C con 5% de CO₂ con glutamina 4mM, estreptomycin (50µg/ml), 1 ml/L de fungizona y suero fetal bovino (SFB) al 15% adicionado con el suplemento F12. Se incubaron de 7 a 10 días para ser caracterizados e infectados *in vitro* con ZIKV.

10.3 Propagación del virus y obtención de cerebros completos

La propagación de ZIKV (Mex/InDRE/sm/2016) se realizó en cerebros de ratones CD1 neonatos (1 a 2 días de nacidos). La titulación del virus se llevó a cabo mediante ensayo de unidades formadoras de placa (UFP) en células BHK-21. Como control negativo se utilizaron cerebros inoculados sin virus,

mismos que se utilizaron para los controles MOCK en todos los experimentos realizados en cerebros completos de ratones CD1.

10.4 Caracterización de cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1

Para la caracterización de las poblaciones celulares se partió de un cultivo enriquecido con astrocitos y microglía el cual fue crecido sobre cubreobjetos circulares de 18 mm de diámetro en placas de 12 pozos y tratados previamente con solución de Poly-L-lysina al 0.1 % (Sigma Aldrich). Al término de cada ensayo la monocapa fue lavada con PBS 1X dos veces y fijadas con paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 30 minutos a 4° C. Las células fijadas fueron permeabilizadas en solución de saponina al 0.02 % y 1 % SFB por 30 min a temperatura ambiente (TA). La pureza del cultivo fue evaluada mediante el marcador de células derivadas de medula ósea como la microglía, CD11b (Cat # ab184308, Abcam, 1:500) y GFP (Cat # Z0334, Dako, 1:500), específico para astrocitos, esperando un 95 a 98% de pureza. Los anticuerpos primarios fueron incubados por 2 horas en solución permeabilizadora. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) por 10 min, para marcar el citoesqueleto de actina se utilizó Fluorescein Phalloidin (Invitrogen, 1:500) durante 2 horas a TA. Para finalizar se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS 1X, seguido de 3 lavados con agua destilada. Posteriormente, se colocaron los cubreobjetos utilizando 15 uL del medio de montaje VECTASHIELD (Vector Labs) sobre los portaobjetos. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio confocal LEICA TCS SP8 MP y analizadas en el programa LEICA LAS X (versión 3.0.16120).

10.5 Infección cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1

Para evaluar la eficiencia de la infección por ZIKV en los cultivos primarios se determinó el porcentaje de infección por citometría de flujo y por microscopía confocal.

Se partió de cultivos incubados entre 7 y 10 días después del aislamiento de las células. Se retiró el medio de cultivo y se infectó a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 con solución HANKS por 2 h a 37° C. Posteriormente, se retiró y se añadió medio DMEM y se incubó por 24, 48 y 72 h. Cumplidas las horas post infección (hpi), la monocapa celular fue levantada mediante una solución de tripsina, recolectando las células en tubos de 1.5 mL, mismos que fueron centrifugados a 800 RPM durante 8 min, retirando el sobrenadante y lavando el botón con PBS 1X y volviendo a centrifugar a las mismas condiciones, al término se fijaron con formaldehído 4%, durante 30 min en agitación.

A continuación, se lavaron con PBS 1 X a 2,200 RPM durante 8 min a 4°C, posteriormente se permeabilizaron con saponina 0.1%, durante otros 30 min en agitación constante.

Para detectar la infección se utilizó el anticuerpo primario 4G2, incubado toda la noche en solución permeabilizadora a 4° C y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario Alexa 488 (1:750). Las células fueron analizadas en el citómetro BD LSRFortessa™ usando el software Flow-Jo.

La infección también fue analizada mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo 4G2, siguiendo las indicaciones antes mencionadas.

10.6 Western Blot

Para evaluar la modulación de RhoA y las vías de la respuesta inmune proinflamatoria y antiinflamatoria se utilizó la técnica de Western Blot.

El cultivo enriquecido con microglía y astrocitos se infectaron con ZIKV a una MOI de 3 por 48 y 72 horas, en formato de placas de 6 pozos (previamente tratadas con Poly-L-lysine solution 0.1 %). El cultivo fue lisado con 200 uL de buffer de lisis RIPA y cuantificados mediante el kit Pierce BCA protein assay (Life technologies), los extractos proteicos totales se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 15%. Las proteínas fueron

transferidas a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con leche al 10% y se incubaron con anticuerpos primarios específicos para la detección de las proteínas en cuestión. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes. La membrana fue revelada mediante quimioluminiscencia utilizando SuperSignal West Femto (Thermo Fisher, 1:1). Como control de carga se utilizó carga β -Actina (Cat #sc-47778, Santa Cruz, 1:1000). Mediante análisis densitométrico se evaluó la intensidad relativa de las bandas, utilizando el software ImageJ bundled with 64-bit Java 8, siendo normalizado frente al control de carga.

10.7 Modulación e inhibición de RhoA

Para evaluar la modulación de la vía de RhoA se usaron anticuerpos anti-pVav3 (Cat #BS-10271R, Invitrogen, 1:500) y de anti-RhoA (Cat. #9968, Cell Signaling, 1:1000) para detectar los niveles totales endógenos. Además, se evaluó la inhibición de la vía de RhoA mediante el inhibidor específico Rho Inhibidor I (Cytoskeleton, 2.0 μ g/mL) añadido dos horas antes de la infección, la cual se incubó por 24 horas. Por otro lado, los fármacos hipolipemiantes que también tienen actividad inhibidora de reordenamiento de citoesqueleto, como Simvastatina (SIM, 5 mM), Atorvastatina (ATR, 5 μ M) y Lovastatina (LOV, 5 mM), además de Metformina (MET, 1 mM) un antidiabético, se usaron como postratamiento durante 24 horas de infección.

10.8 Evaluación de respuesta antiinflamatoria y proinflamatoria

Para evaluar la vía antiinflamatoria SOCS, se usaron los anticuerpos anti-SOCS1 (Cat #PA5-27239, 1:1000) Invitrogen y anti-SOCS3 (Cat #52113, Cell Signaling, 1:500). Mientras que para la respuesta proinflamatoria se utilizaron los anticuerpos anti-IRF-3 (sc-33641, 1:1000) y anti-NF- κ B (sc-8008, 1:1000) Los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche a 4°C, seguido de 3 lavados con TBS 1X/Tritón 0.01% durante 5 min en agitación fuerte. Finalmente, se usaron anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón acoplado a la enzima HRP, incubados durante una hora en agitación a TA

(siendo lavadas 3 veces con TBS 1X/Tritón 0.01% a las mismas condiciones).

10.9 Evaluación de la expresión de genes *socs* y *rhoa*.

La monocapa de células fue cultivada en placas de 6 pozos. Una vez terminado el tiempo de tratamiento, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X y resuspendidas en Trizol (Thermo Fisher). La extracción de RNA se llevó a cabo por el método descrito por Chomczynski & Sacchi, 2006. Una vez obtenido el ARN, este se cuantificó, en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a una absorbancia de 260 nm. La pureza fue evaluada por relación de absorbancias A260/280. Las lecturas constaron de dos repeticiones por cada muestra de ARN.

Para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) utilizo el Kit qPCRBIO SyGreen 1-Step Go Hi-ROX (PCR BIOSYSTEMS), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizando *primers* para *socs1* y *socs3* (Cuadro 1). Las reacciones se analizaron en el equipo de PCR Tiempo Real ECO 48 (Illumina).

Los datos se evaluaron mediante la formula $CT (2^{-\Delta \Delta CT})$ comparando las diferencias relativas con el gen endógenos *gapdh* (Cuadro 1).

Tabla 1. Oligos utilizados para amplificar genes relacionados con la respuesta inmune innata y control de infección

Gen	Forward	Reverse
<i>socs1</i>	5-CGCCAACGGAAGCTTCTTC-3'	5-TCAGGTAGTCACGGAGTACC-3
<i>socs3</i>	5-CTTTGTAGACTTCACGGCTG-3	5-TATGGTCCCCGAGGCGAG-3
<i>gapdh</i>	5-TGTTTTGTGCCGTTTACCAA-3	5-GGTAAGAGAGCCAGCCACTG-3

10.10 Estadística

El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism versión 8. Los datos se tomaron en desviación estándar (SD). Para determinar la diferencia estadística

entre los diferentes tiempos postinfección y el control sin infección. Los resultados fueron normalizados y expresados para comparar las células infectadas y las no infectadas, en cada experimento se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA), y los datos se compararon con la prueba de Dunnett. Una $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

11. RESULTADOS

11.1 Evaluación *in silico* de la interacción de la proteína VAV3, comparada en ratón y humano

El análisis bioinformático de las interacciones de Vav3 de ratón y humano fue generado en la plataforma STRING (Figura 13 A). Una de las vías en donde esta proteína está implicada es la de GTPasas de Rho, como lo es RhoA, cdc42 y Rac1. Estas interacciones, descritas en humanos parecen estar conservadas en el ratón como lo indicó el análisis de STRING. Este hecho sugiere que la actividad de estas su GTPasas de Rho, se comparte en ambos modelos.

El puntaje obtenido con la base de datos en lo reportado anteriormente sobre la interacción con GTPasas de la familia de Rho (Figura 13 B), muestra la probabilidad de que estas interactúen con la proteína Vav3. En los resultados con las proteínas de *Mus musculus* podemos apreciar como cdc42 es la GTPasa reportada con mayor probabilidad de interactuar con Vav3, mientras que RhoA está en un segundo lugar.

Con las proteínas de *Homo sapiens* esta relación cambia ya que RhoA es la GTPasa es la GTPasa con la mayor probabilidad de interactuar con Vav3, mientras que cdc42 está en un segundo lugar, por otra parte aparece Rac1 otro miembro de esta misma familia, el cual también puede interactuar con Vav3.

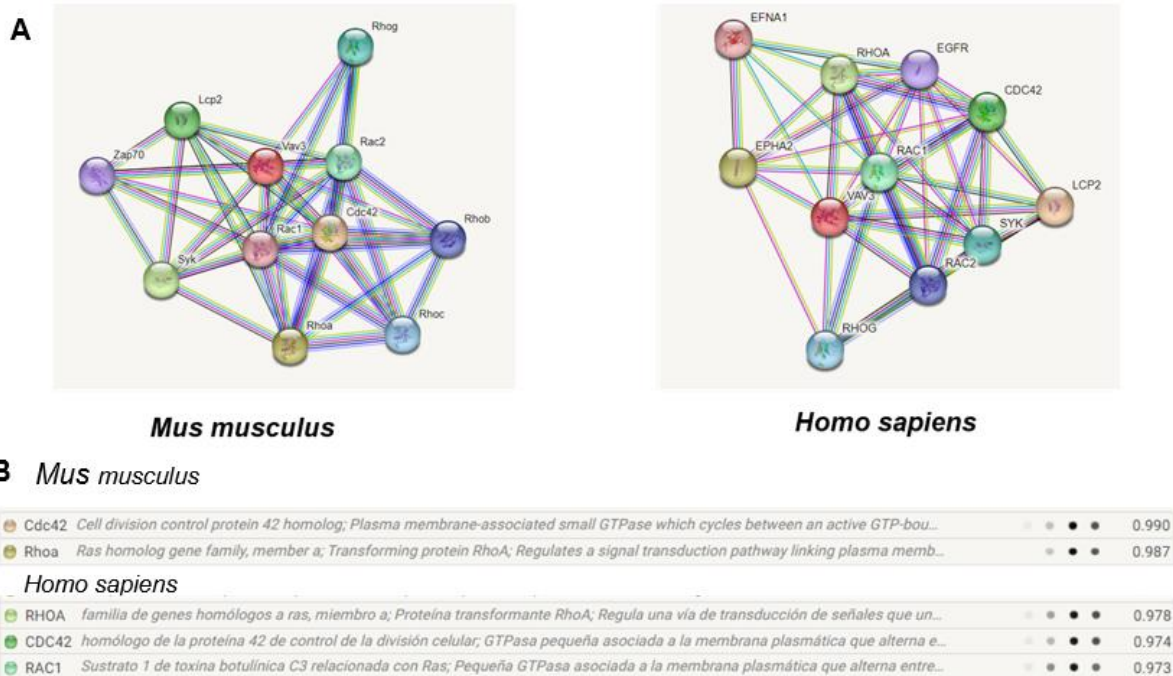


Figura 13. Análisis bioinformático de la proteína Vav3. A) En ratones la proteína Vav3 tiene la capacidad de interactuar con RhoA, cdc42 y Rac1 en humanos. B) el resumen de resultados sugiere que para *Mus musculus* la probabilidad de que Vav3 interactúe con cdc42 es mayor, mientras que en *Homo sapiens* RhoA posee mayor probabilidad de interactuar con Vav3.

11.2 . Estandarización de cultivo primario y evaluación del cultivo enriquecido con microglía y astrocitos de ratones CD1

Los cultivos primarios fueron obtenidos y caracterizados siguiendo el protocolo previamente descrito por Bronstein et al., 2013. El cultivo partió en formatos de 6 y 12 pozos, mismos que fueron cultivados a partir de un concentrado total de 10 a 12 cerebros de ratones neonatos (3-5 días) previamente procesados. El cultivo se utilizó al cabo de 7 y 10 días con la finalidad de lograr la diferenciación celular y aumentar el número de células en el cultivo. Para evaluar la presencia de microglía y astrocitos se caracterizaron morfológicamente mediante microcopia de campo luminoso, aprovechando las diferencias entre ambas (Figura 14 A). Además, se realizó una caracterización utilizando marcadores específicos de cada población mediante microscopia

confocal (Figura 14 B). La presencia de CD11b (propio de células de la médula ósea) se utilizó como marcador de microglía y la proteína fibrilar acídica de la glía o GAFP (encontrada en filamentos intermedios astrocitos y células de Schwann) como marcador de astrocitos. en este caso, el marcador de la morfología celular coincide según puede observarse en la figura 14 B.

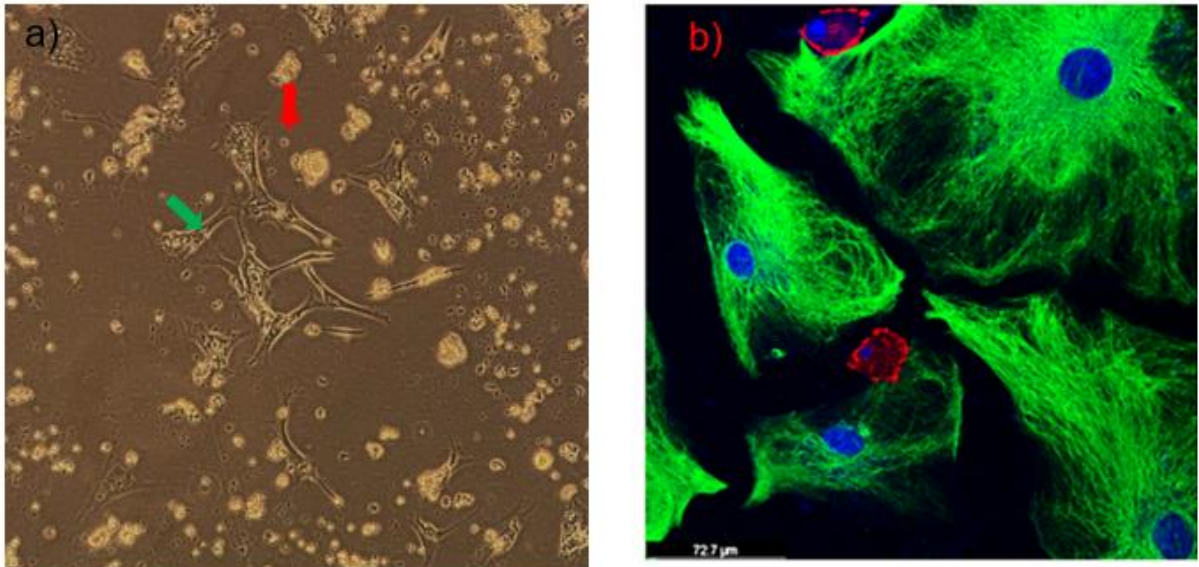


Figura 14. Caracterización del cultivo primario. A) células en campo claro 40X, donde se observa microglía (flecha roja) y astrocitos (flecha verde). B) micrografía confocal de fluorescencia 40x, en rojo podemos ver el marcador CD11b correspondiente a células de la microglía y en verde la PAFG correspondiente a astrocitos

11.3 Células del cultivo primario de ratón CD1 representan un buen modelo para el estudio de neuroinfección por ZIKV

Para determinar si las células del cultivo primario podían infectarse con el ZIKV, se sembraron en placas de 6 pozos a una confluencia del 70 al 90% y se infectaron a un MOI de 3 y el porcentaje de células infectadas se determinó a las 48 y 72 hpi mediante citometría de flujo. En las 48 hpi se detectó un 15%, de células infectadas, a las 72 hpi el porcentaje de infección se incrementó al 55% (Figura 15).

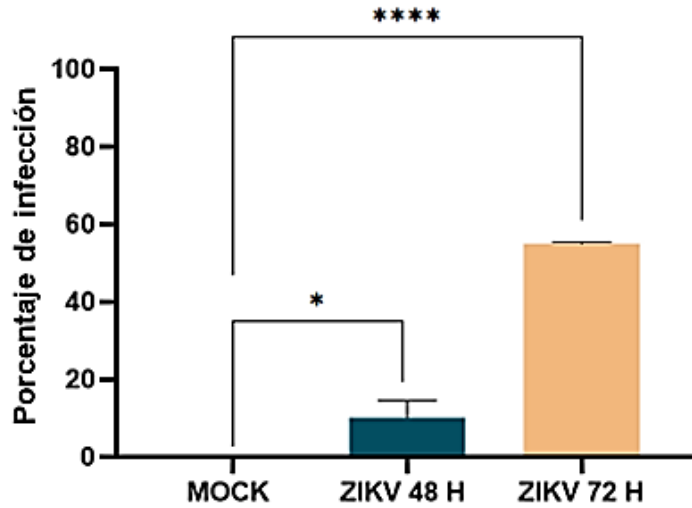


Figura 15. Porcentaje de infección *in vitro*. Células infectadas a una MOI de 3 por 48 y 72 hpi. Las gráficas representan las medias \pm SD de n = 3 experimentos independientes. **** $p < 0,001$.

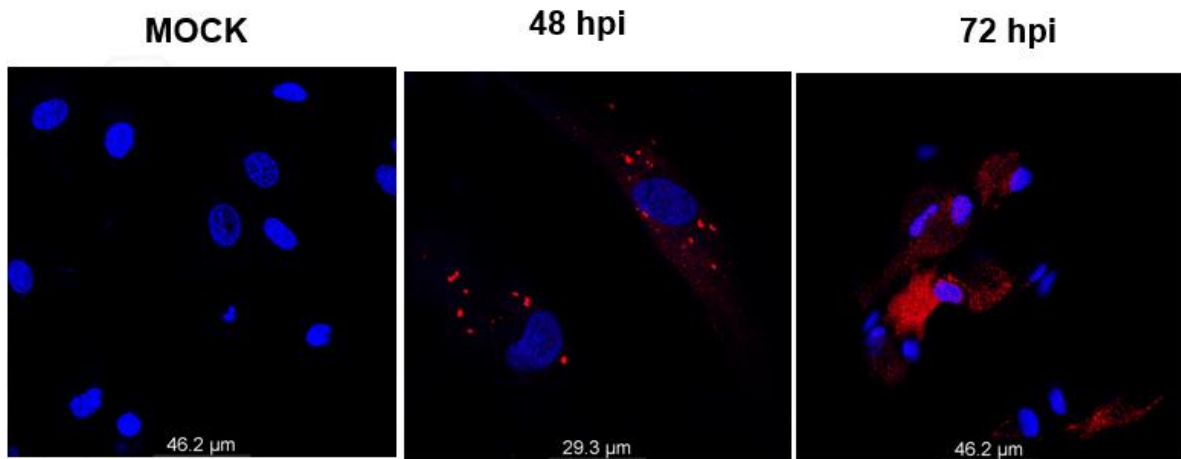


Figura 16. Caracterización de la infección mediante microscopía confocal. Las células fueron tratadas con una MOI=3 con ZIKV, durante 48 hpi con una menor marca de la infección y 72 hpi mostrando una incendiada en la marca de la infección. Las células fueron fijadas fueron marcadas con la proteína NS3 de ZIKV (rojo) y los núcleos fueron teñidos con Hoechst en azul.

Por consiguiente, todos los ensayos fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones, comparadas frente al tratamiento no infectado o MOCK.

Una vez comprobado la infección del cultivo primario mediante citometría de flujo, se procedió a montar el cultivo en laminillas para su análisis por

microscopia confocal. Para ello, las células fueron infectadas por 48 y 72 hrs, fijadas y marcadas con el anticuerpo anti-NS3 de ZIKV y Hoechst para teñir de azul los núcleos. Como puede observarse, la cantidad de células teñidas con el anticuerpo anti-NS3 se aprecia desde las 48hpi y aumenta a 72 hpi (Figura 16) lo que correlaciona con el porcentaje de infección obtenido por citometría de flujo. Además, en las imágenes de microscopia confocal pudimos observar elementos característicos de la infección con ZIKV como alteraciones en núcleo de la célula y cambio en su morfología celular.

11.4 La infección por ZIKV incrementa la expresión del RNAm y los niveles de proteína de SOCS1/3 en cerebros de ratones CD1

La expresión de los genes de *socs1* y *socs3* se llevó a cabo mediante la técnica de PCR tiempo real, mediante la extracción de RNA de cerebros de ratones CD1 neonatos. Los niveles relativos *socs1* se mantuvieron sin diferencia significativa entre el día 2 y 3 posinfección (Figura 17, A). Sin embargo, en el día cuatro lo cual está relacionado con el día en que los ratones murieron por la infección.

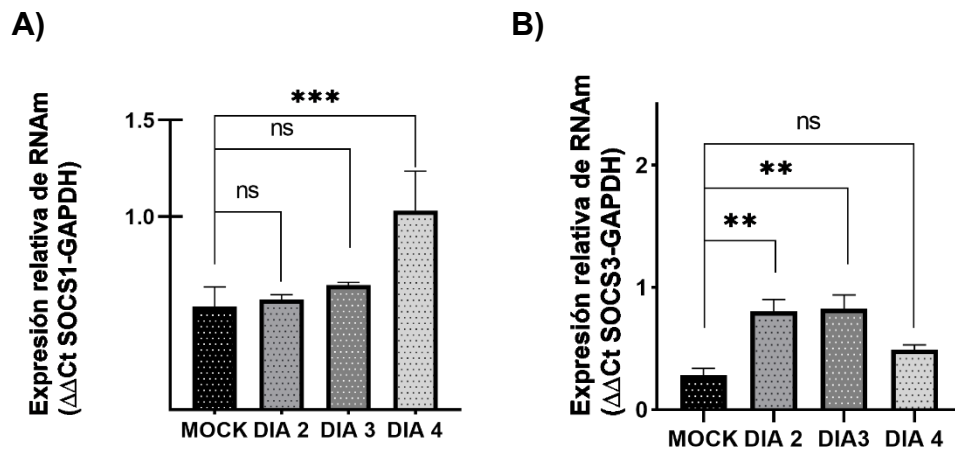


Figura 17. Niveles relativos de genes *socs1* y *socs3* en cerebros completos de ratones CD1. A) expresión relativa de *socs1* mostrando un aumento relacionado con la infección por ZIKV. B) *socs3* aumenta su expresión al día dos se mantiene hasta el día tres, mientras que en el día cuatro hay un decremento no significativo. Todos los genes fueron normalizados utilizando como gen constitutivo *gapdh*. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de $n = 3$ experimentos independientes. ** $p < 0.0049$, *** $p < 0.0006$.

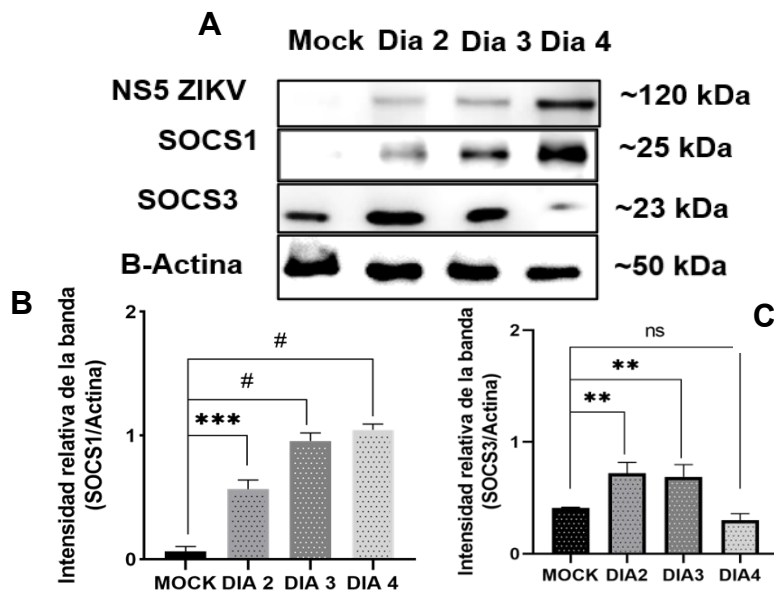


Figura 18. Expresión relativa de la proteína SOCS en cerebros completos de ratones CD1. SOCS3 mostró una tendencia diferencial durante los días posinfección, siendo los días dos y cuatro los que presentan un mayor aumento y diferencia significativa, sugiriendo que su producción es crucial durante los primeros días de la infección. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de $n = 3$ experimentos independientes. ** $p < 0.0060$, *** $p < 0.0004$, # $p < 0.0001$.

No obstante, la expresión del gen *socs3* mostró una cinética distinta, observándose un incremento en la expresión durante los días dos y tres dpi mientras que en el día cuatro decaía la expresión (Figura 17 B), aunque se mantiene superior a los niveles MOCK, los resultados sugieren que *socs1* puede estar relacionado directamente con una supresión de citocinas en el cerebro mientras que *socs3* podría jugar un papel importante durante la supresión de citocinas en los primeros días de infección.

Para corroborar si esta modulación de los genes *socs1/3* se reflejaba en los niveles de proteína, se realizaron ensayos de Western Blot y la cuantificación mediante densitometría.

Los niveles de expresión de la proteína SOCS1 (Figura 18 A) aumentaron en relación con los dpi. La densitometría de las bandas mostró diferencias significativas durante todos los dpi siendo los días tres y cuatro en donde se encontró una mayor diferencia. A su vez, la proteína SOCS3 (Figura 18 B) tuvo

una tendencia similar a lo observado en sus niveles del RNAm, en donde se mantiene el aumento a los días dos y tres por infección y se observa un decaimiento no significativo al cuarto día. Apoyando la idea de que los SOCS1 puede tener actividad tardía mientras que SOCS3 una actividad mayor a tiempos tempranos de la infección (Figura 18 C).

11.5 La infección por ZIKV incrementa la expresión del RNAm y los niveles de proteína de SOCS1/3 en cultivos primarios enriquecidos con microglía

Para confirmar los datos obtenidos *in vivo* se llevó a cabo la infección de los cultivos primarios enriquecidos con microglías, en donde se evaluaron los genes y proteínas de SCOS1/3, mismos que mostraron una tendencia similar a la observada en cerebros completos.

La expresión relativa de los genes *socs1/3* (Figura 19 A), sugirió un aumento de *socs1* significativo a las 48 hpi y 72 hpi esto en relación con el Mock, mientras que *socs3* (Figura 19 B) se encontró un aumento significativo a las 48 hpi y una tendencia al decremento a 72 hpi, en relación con la condición MOCK, sugiriendo una tendencia al incremento en la expresión más temprana en comparación con *socs1*.

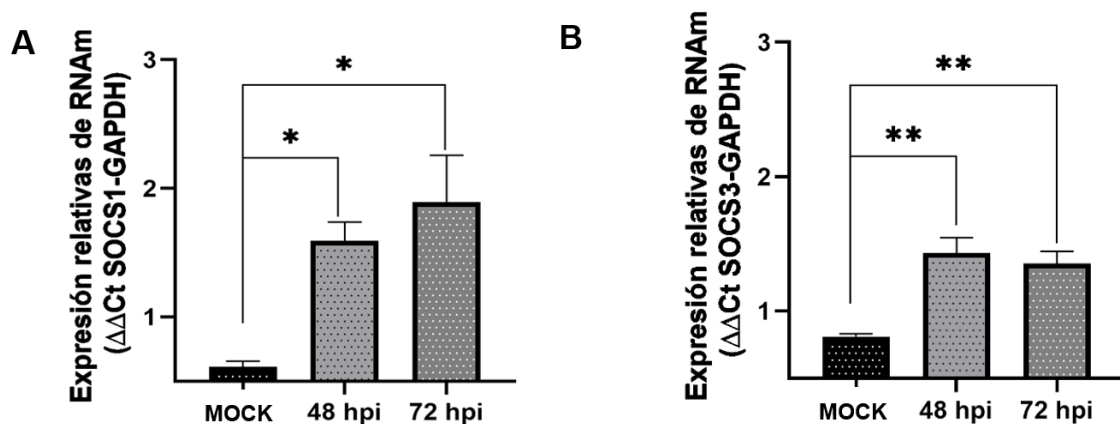


Figura 19. Niveles relativos de genes *socs1* y *socs3* en cultivos primarios enriquecidos con microglía de ratón. A) expresión relativa de *socs1* mostrando un aumento en relación con la infección por ZIKV. B) *socs3* aumenta su expresión a las 48 hpi y una tendencia al decremento a las 72 hpi. Todos los genes fueron normalizados utilizando como gen constitutivo *gapdh*. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de $n = 3$ experimentos independientes. * $p < 0.0407$, ** $p < 0.0072$.

Los niveles de expresión de la proteína SOCS1 (Figura 20) se correlacionaron con los niveles del transcrito en donde se ve una tendencia al aumento de los niveles relativos de la banda a 48 hpi y 72 hpi. Por otra parte, SOCS3 (Figura 20 B) muestra un aumento a 48 hpi y un decremento de la proteína a los niveles basales a 72 hpi, al igual que en su transcrito. Estos resultados sugieren que SOCS1 podría estar participando en una respuesta antiinflamatoria a horas tardías de la infección (Figura 20 C), mientras que SOCS3 pudiera participar a horas tempranas de la infección y la regulación de ambas proteínas está dada a nivel de su RNAm y proteína.

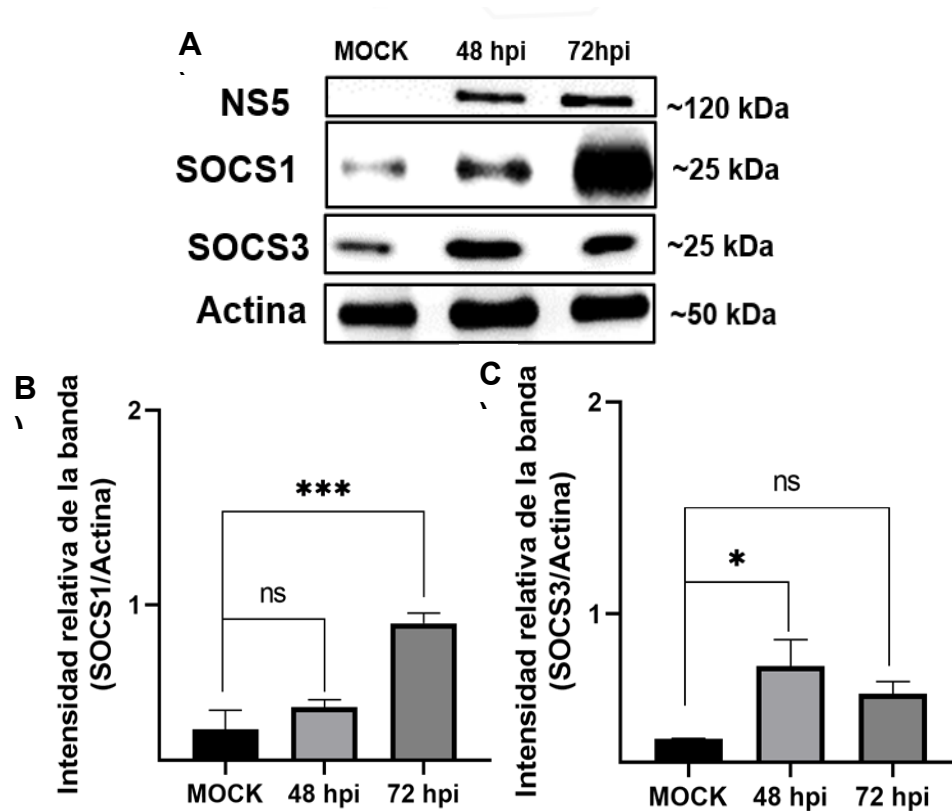


Figura 20. Expresión relativa de la proteína SOCS en cultivos primarios enriquecidos con microglía de ratón. A) Western Blot de en cultivos primarios enriquecidos con microglía durante 48 y 72 hpi. B) densitometría de bandas de SOCS1. C) densitometría de bandas de SOCS3. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de $n = 3$ experimentos independientes. * $p < 0.0389$, *** $p < 0.0005$.

11.6 La infección por ZIKV incrementa los niveles de RhoA en cerebros de ratón y en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro de ratón CD1

Para evaluar si la expresión de los niveles endógenos totales de RhoA está siendo modulada durante la infección con ZIKV en cerebros de ratones CD1 se evaluaron los niveles de la proteína total durante mediante Western Blot.

Los niveles endógenos totales de RhoA (Figura 21) se vieron incrementados de manera significativa al cuarto dpi en relación con la condición MOCK.

Para confirmar los resultados obtenidos en cerebros completos se evaluó la modulación de los niveles endógenos totales de la proteína RhoA en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1 infectados *in vitro* por ZIKV a 48 y 72 hpi (Figura 22). Mismos que mostraron una tendencia similar a lo observado en los cerebros completos, principalmente presentando una tendencia al incremento a 48 y 72 hpi con una diferencia significativa frente a la condición MOCK.

Los datos sugieren que este aumento puede ser dependiente a la infección y la modulación de RhoA pudiera estar favoreciendo la infección y la replicación de ZIKV en el cerebro.

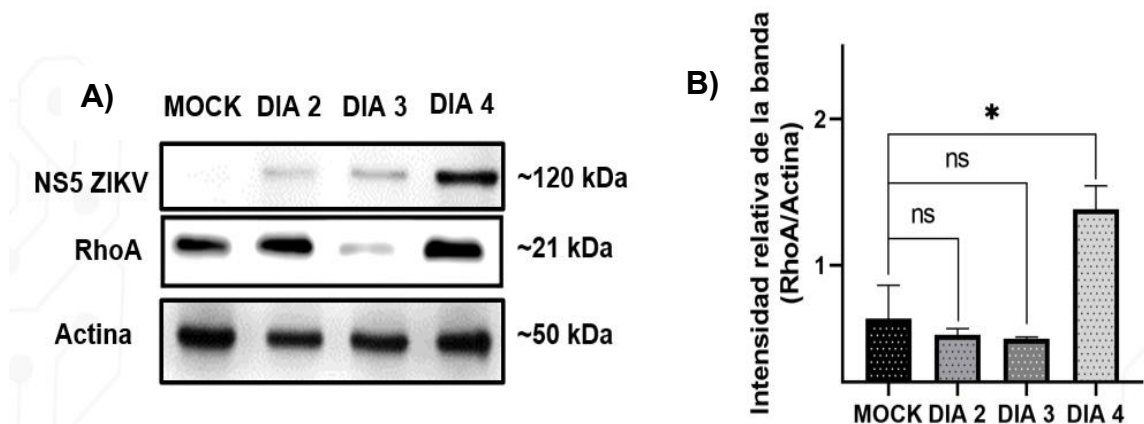


Figura 21. Modulación de los niveles endógenos totales de RhoA en cerebros completos de ratones CD1. A) detección por Western Blot de la proteína RhoA en cerebros completos de ratones CD1. B) densitometría de las bandas correspondientes a la proteína RhoA. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de $n = 3$ experimentos independientes. * $p < 0.0147$.



Figura 22. Modulación de niveles endógenos totales de RhoA en cultivos primarios enriquecidos con microglía de ratón. A) Western Blot de los días posinfección en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1 durante la infección por ZIKV a 48 y 72 horas. B) densitometría de bandas de RhoA. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de $n=3$ experimentos independientes. ** $p < 0.0024$, # $p < 0.0001$.

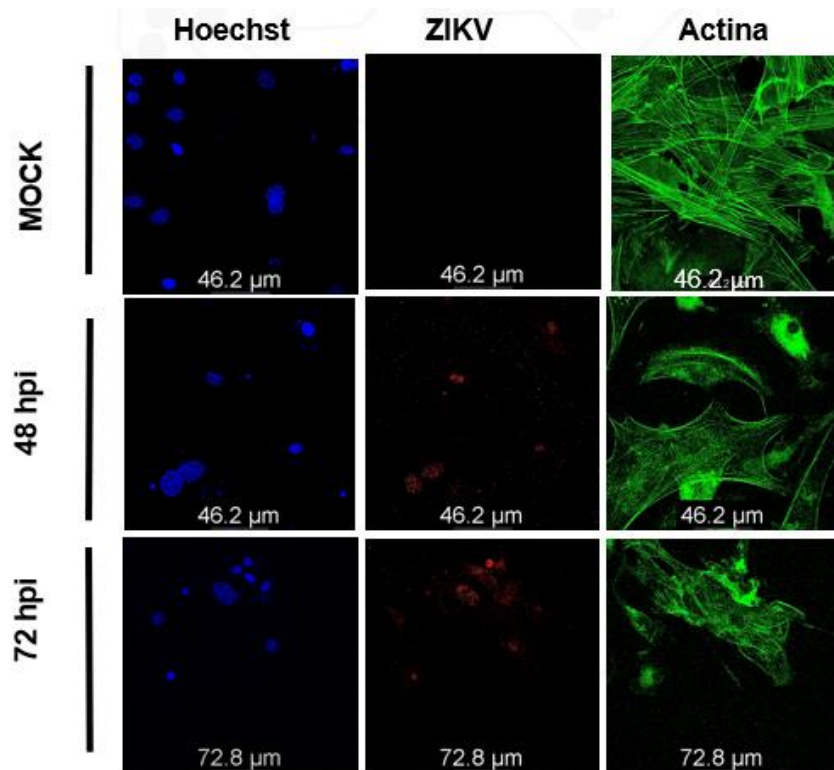


Figura 23. Reordenamiento del citoesqueleto de actina durante infecciones por ZIKV. Las células fueron teñidas en azul el núcleo, la proteína NS5 de ZIKV en rojo y en verde el citoesqueleto de actina

En este sentido, sabiendo que la modulación de los niveles endógenos totales de RhoA pueden estar relacionados con el aumento de la infección, quisimos estudiar si existía un cambio de la morfología celular. Para esto, se hicieron inmunofluorescencias marcando a la proteína NS5 de ZIKV y el citoesqueleto de actina con faloidina. Se observó un cambio en la formación de los filamentos de actina a 48 y 72 hpi, mostrando un reordenamiento drástico del citoesqueleto a 72 hpi (Figura 23). Estos datos sugieren que la participación del virus y la modulación de los niveles endógenos totales de RhoA podrían estar involucrados en este proceso.

9.7 La modulación de los niveles endógenos totales RhoA puede estar relacionada con IRF-3 y NF- κ B en la respuesta inmune proinflamatoria en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1

Sabiendo que la modulación de las vías de señalización proinflamatorias comienza con la alteración en la señalización de GTPasas como RhoA, se evaluaron los niveles totales de las proteínas de señalización tota IRF-3 y NF- κ B, a 48 y 72 hpi por ZIKV mediante Western Blot (Figura 24). Aunque se observó una reducción significativa en la expresión de ambas proteínas, IRF-3 mostró disminución a las 48 y 72 hpi, mientras que NF- κ B sufrió una tendencia similar, disminuyendo a 48 hpi con una tendencia de recuperación, aunque no significativa a 72 hpi. La modulación de NF- κ B fue similar a la encontrada para RhoA (Figura 23).

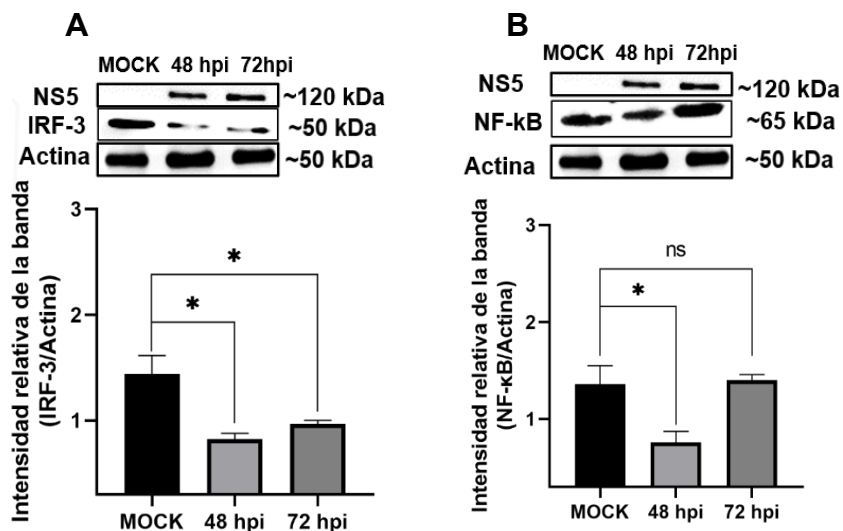


Figura 24. Evaluación de proteínas relacionadas con la respuesta inmune proinflamatoria en cultivos primarios enriquecidos con microglía de ratón. A) Western Blot y densitometría de bandas de IRF-3 durante la infección por ZIKV a 48 y 72 hpi. B) Western Blot y densitometría de bandas de NF-kB durante la infección por ZIKV a 48 y 72 hpi. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de n= 3 experimentos independientes. * p <0.0378, * p <0.0327.

Ambos resultados sugieren que durante las infecciones por ZIKV la respuesta antiinflamatoria y/o proinflamatorias sufren alteraciones diferenciales.

11.7 La modulación de niveles endógenos totales de RhoA no es dependiente de la proteína Vav3 en cerebros y en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1

Para corroborar como se estaba activado RhoA, fue necesario buscar una proteína río arriba que pudiera estar llevando a cabo esta función como lo es Vav3. Los niveles de la forma activa de la proteína Vav3 durante la infección *in vivo* de cerebros completos de ratones CD1 infectados con ZIKV se evaluaron mediante Western Blot (Figura 25) con estos ensayos de puso observar la activación de Vav3 al tercer dpi y tuvo un decremento significativo al cuarto dpi, lo cual muestra una tendencia diferencial con respecto a los

resulta de RhoA en cerebros completos (Figura 22). Para determinar si este mismo proceso ocurre pasar en el modelo *in vitro* se llevó a cabo la infección a 48 y 72 hpi, en donde se detectó a la proteína la Vav3 activa (Figura 26). Sufre un decremento de la activación a 48 hpi y una tendencia a restaurar los niveles similares a la condición MOCK a 72 hpi. Esto demostrando que en ningún modelo existe una correlación entre los niveles de RhoA y Vav3 observa.

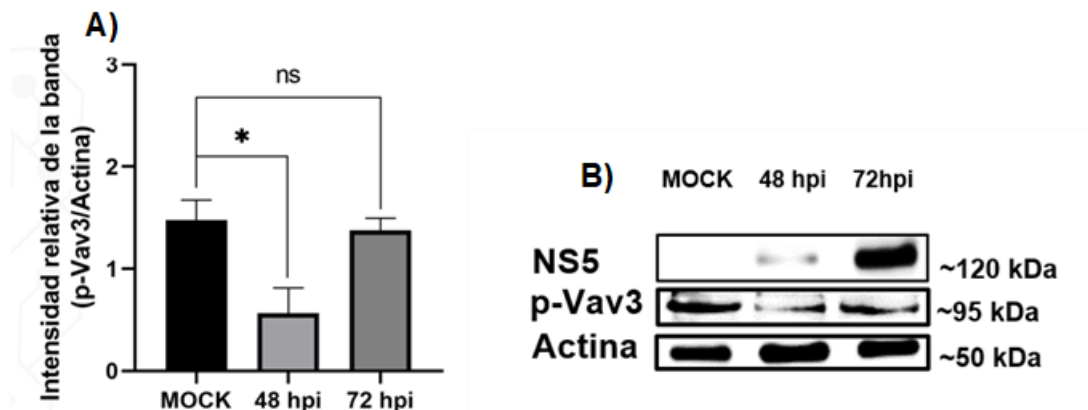


Figura 25. Activación de p-Vav3 en cultivos enriquecidos en cerebro ratón CD1
 A) Niveles de la proteína p-Vav3 en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1 a tres y cuatro días postinfección con el ZikV. B) densitometría de bandas de p-Vav3. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de n= 3 experimentos independientes. * $p < 0.0281$.

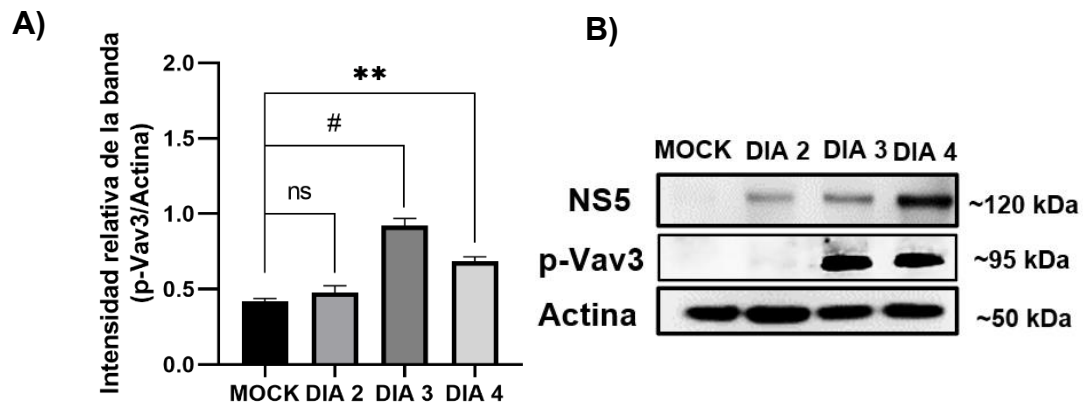


Figura 26. Activación de p-Vav3 en cultivos enriquecidos en cerebro ratón CD1
 A) Niveles de la proteína p-Vav3 en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1 tres y cuatro días postinfección con el ZikV. B) densitometría de bandas de p-Vav3. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de n= 3 experimentos independientes. * $p < 0.0281$.

11.8 Los fármacos hipolipemiantes modulan la vía de RhoA en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1

Sabiendo que la inhibición de la actividad de RhoA inducía una reducción de la infección con ZIKV, decidimos emplear otros inhibidores de la vía de señalización de RhoA, con fármacos aprobados por la FDA y de uso comercial. Se emplearon fármacos de la familia de las estatinas como, Simvastatina (SIM, 5 mM), Atorvastatina (ATR, 5 μ M) y Lovastatina (LOV, 5 mM), además de Metformina (MET, 1 mM) un antidiabético. Todos los fármacos demostraron tener características hipolipemiantes y antivirales previamente reportados. A pesar de que el blanco de estos compuestos no son las GTPasas, estos son capaces de inhibir su activación, sobre todo por la falta de prenilación observada al reducir los niveles de colesterol.

Los fármacos se incubaron 24 horas en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro de ratón CD1 y los niveles de expresión se evaluaron mediante Western Blot. Los ensayos en cultivos primarios MOCK e Infectados tratados con los diferentes fármacos mostraron que ATR y MET redujeron los niveles endógenos totales de RhoA, mientras que LOV y SIM no indujo una reducción de los niveles totales endógenos de RhoA con respecto al control MOCK/DMSO y MOCK (Figura 27).

Para evaluar si esta disminución en RhoA está relacionada con la disminución en la infección, se llevó a cabo un ensayo en donde los fármacos se administraron 24 hpi de ZIKV en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD y se determinaron los niveles de expresión de NS5.

Los resultados del ensayo mostraron que ART y MET son los fármacos en donde disminuye la presencia de la proteína NS5 en comparación con el control de infección (Ci) y con vehículo DMSO (Figura 28). Por otra parte, LOV mostró una disminución mayor de NS5 mientras que no se observó una disminución de RhoA, así mismo, SIM parece aumentar la presencia de NS5 y no presenta alteraciones en RhoA en comparación los Ci/DMSO y Ci (Figura 28).

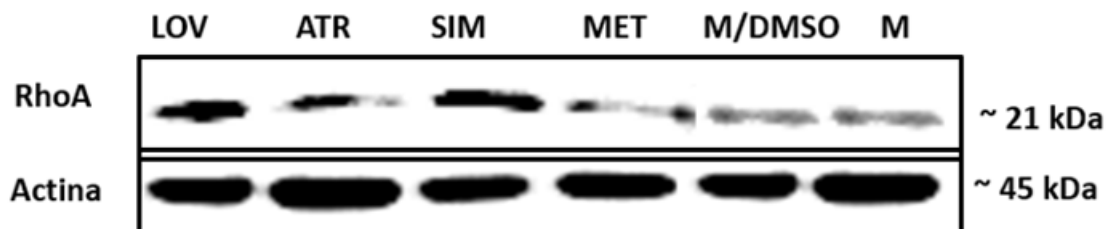


Figura 27. Evaluación de fármacos hipolipemiantes sobre los niveles endógenos totales de RhoA en ensayos MOCK en cultivos primarios enriquecidos con microglía de ratón. Los fármacos fueron colocados durante 24 horas en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1, mismos que mostraron inhibiciones diferenciales, en ATR y MET mostraron un mayor grado de disminución de RhoA. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de $n=3$ experimentos independientes.

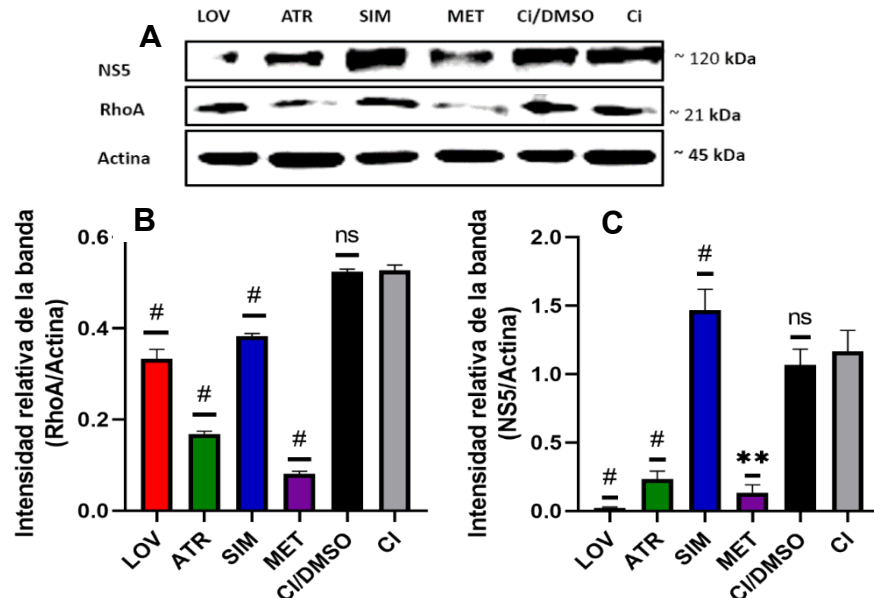


Figura 28. Evaluación de fármacos hipolipemiantes sobre los niveles endógenos totales de RhoA en ensayos de 24 hpi por ZIKV en cultivos primarios enriquecidos con microglía de ratón. A) Los fármacos fueron colocados durante 24 hpi por ZIK en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1, mismos que mostraron inhibiciones diferenciales, ATR y MET mostraron un mayor grado de disminución los niveles endógenos totales de B) RhoA y la proteína C) NS5. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de n= 3 experimentos independientes, mediante una comparación múltiples con CI. . **p < 0.0024, # p < 0.0001

11.9 La modulación de la vía de RhoA reduce la infección de ZIKV en cultivos enriquecidos con microglía de cerebro ratón CD1

Con la intención de validar la participación de RhoA durante la infección con ZIKV, se utilizó el inhibidor específico de la familia de las GTPasas de Rho. El inhibidor llamado CT04. Las células se trataron por dos horas con CT04 antes de la infección. La infección se permitió por 24 horas y los niveles de la expresión de RhoA se analizaron por Western blot (Figura 29).

En presencia del inhibidor CT04 se observó una reducción de la cantidad de la proteína en presencia del inhibidor, interesantemente, en presencia del inhibidor se observó una disminución significativa de la banda de la proteína NS5 del ZIKV, esto comparado con los niveles de proteína control de infección

sin el inhibidor (Figura 29). Sugiriendo que esta disminución está relacionada con la inactivación de la vía de RhoA.

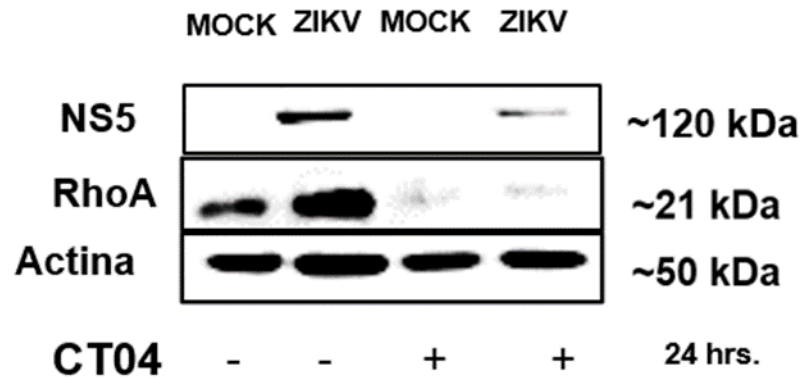


Figura 29. Inhibición selectiva de la vía de señalización de RhoA en cultivos primarios enriquecidos con microglía de ratón. Los carriles marcados con un signo “-” fueron los controles sin inhibición, en donde se observó la activación en un contexto de infección por ZIKV. En los tratamientos marcados con un signo “+” en donde se administró el inhibidor dos horas antes de la infección se aprecia una disminución en las bandas de RhoA, además, de una disminución en la proteína viral NS5. Los resultados se representaron con el software Graph Pad Prism versión 8.0. Las gráficas representan las medias \pm SD de n= 3 experimentos independientes.

12. DISCUSIÓN

Las enfermedades producidas por *flavivirus* siguen siendo un problema de salud pública en zonas tropicales y países en vías de desarrollo, esto debido a la circulación de estos, y aunado a baja accesibilidad de tratamientos y vacunas lo cual provoca que las enfermedades causadas por estos virus sean poco atendidas. Algunos *flavivirus* como ZIKV, poseen la capacidad de provocar manifestaciones congénitas en el cerebro y síndromes neuroinmunes en adultos, aun cuando la enfermedad es resuelta por el paciente (Baud et al., 2017). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias para el control de ZIKV en el cerebro es una necesidad. Actualmente, se conoce que ZIKV altera múltiples vías de señalización en el cerebro, mismas que participan en apoptosis, respuesta antiviral y cambio de subpoblaciones proinflamatoria y/o antiinflamatoria de la microglía en el cerebro.

Una de la vías de señalización que puede estar implicada durante algunas patologías neurodegenerativas, es la vía de GTPasas RhoA, en donde se ha visto que su modulación se relaciona con cambios en el citoesqueleto y alteración en la respuesta inmune, aunque aún se encuentra poco estudiado este mecanismo durante infecciones virales (Mulherkar & Tolia, 2020). Las GTPasas son activadas mediante proteínas GEF, mismas que regulan la relación entre GDP y GTP, siendo un mecanismo de activación e inactivación. En el cerebro las GEF juegan un papel importante, algunas como las de la familia de las Vav, en específico Vav3 están relacionadas con la activación de RhoA en el cerebro (Bustelo, 2014). Nuestros resultados *in silico* mostraron que la interacción entre Vav3 con algunas GTPasas puede ser diferencial y ambigua. En el genoma de ratón encontramos que cdc42 es la GTPasa con mayor probabilidad de interactuar con Vav3, mientras que RhoA se encuentra en segundo lugar de interacción. Por otra parte, en humanos RhoA es la GTPasa con la mayor capacidad de interactuar con Vav3, mientras que cdc42 se encuentra en segundo lugar, a su vez, se encontró que Rac1 puede

estar interaccionando con Vav3, mostrando que la interacción puede ser también marcadamente diferencial. Algunos autores sugieren que esta regulación diferencial está relacionada con la respuesta inmune, en algunas infecciones por virus, como el Gammaherpesvirus murino 68; utilizando un modelo animal deficiente en la expresión de proteínas Vav, se encontró una mayor latencia viral en linfocitos B, además un sesgo al subtipo M2, apoyando la idea de la interacción entre M2/Vav (Rodríguez et al., 2006).

Los genes SOCS juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune, en un estado no patológico estos genes modulan la resolución de la inflamación y propician la restauración de tejidos (Ghafouri-Fard et al., 2018). Estos genes SOCS se han relacionado con la regulación de las proteínas Vav, en donde la sobre expresión de SOCS1 resulta en la degradación de las proteínas Vav vía proteasoma, mediante su interacción con el dominio SH2, conduciéndolas a ubiquitinación (De Sepulveda et al., 2000). Los resultados obtenidos de este estudio mostraron un aumento en la expresión tanto del RNAm y proteína de SOCS1 al cuarto dpi en cerebros completos y a las 72 hpi, en cultivos primarios, lo que sugiere que siguen la misma tendencia que durante curso de la infección. Por otro lado, SOCS3 a nivel de RNAm y proteína mostró un aumento a dos y tres dpi en cerebros completos y en cultivos primarios a las 48 y 72 hpi, y en ambos casos se observó una tendencia a disminuir aunque no significativa a tiempos tardíos. Estos resultados apoyan la idea de que los genes SOCS pueden ser activados durante las infecciones por ZIKV, además de que el aumento de SOCS1 sigue el curso de la infección y puede estar ayudando a la modulación de la respuesta antiinflamatoria temprana (Seong et al., 2020). La idea de que SOCS3 regule procesos tempranos, está relacionada con la infección por ZIKV de células madre neuroepiteliales mesocorticales y de la médula espinal *in vitro*, en donde la sobre expresión de SOCS3 a 4 hpi se relacionaba con el agotamiento de los centrosomas, además de la traslocación de p-TBK1 de los

centrosomas a la mitocondria, generando mitosis interrumpidas (Onorati et al., 2016).

La vía de SOCS no solo puede estar modulando la respuesta inmune, sino que también se relaciona con otras vías como la de Vav/RhoA, misma que tiene la capacidad de regular procesos en la formación del citoesqueleto y respuesta inmune, además de que la modulación de la vía de RhoA está relacionada con enfermedades neurodegenerativas, cambio en las subpoblaciones M1/M2 de las células de la microglía y reordenamiento del citoesqueleto (Mulherkar & Tolias, 2020). Esto último respaldan los datos propuestos por Nie et al., 2021 en donde observamos un cambio en el citoesqueleto de actina durante infecciones de ZIKV en células de la Barrera Hemato-Testicular de ratón, mismo que observamos en nuestras inmunofluorescencias de cultivo primario de cerebro de ratón CD1 en donde el reordenamiento de actina era evidente a las 48 y 72 hpi. Remarcando que puede ser un mecanismo por el cual el virus puede cruzar la Barrera Hematoencefálica y llegar al cerebro.

Los resultados obtenidos indican que la proteína RhoA experimenta un aumento significativo de su expresión durante la infección por ZIKV en cerebros completos al cuarto dpi, mientras que en cultivos primarios su aumento fue significativo a partir de las 48 y 72 hpi y está relacionado con la infección. Nuestros datos contradicen el modelo planteado por Norbury et al., 2022, en donde menciona que el aumento de los genes SOCS1, puede modular la degradación de las proteínas Vav y esto puede influir en los niveles celulares de RhoA, teniendo en cuenta que nuestros resultados indican que los genes SOCS son activados durante toda la infección.

Para evaluar si Vav3 puede estar interactuando y confirmar los resultados *in silico* en relación con la interacción diferencial de RhoA en ratón y humano, se midió a la proteína Vav3 activa, misma que se moduló durante toda la infección pero su modulación no estaba relacionada con los resultados obtenidos en RhoA en cerebros completos y en cultivos primarios. Estos resultados sugieren

que la actividad de Vav puede no ser lineal y tener la capacidad de estar activando a otras GTPasas de la familia de Rho. Algunos autores mencionan que las isoformas de Vav pueden tener papeles redundantes o específicos dependiendo del contexto celular que desempeñen, mismo que puede desencadenar una activación de GTPasas diferencial (Wells et al., 2005). Esto puede explicar por qué en nuestros resultados vemos que los niveles endógenos totales de RhoA se aumentan a diferencia de disminuir por la posible regulación negativa de SOCS1 hacia Vav. Entendiendo esta relación podemos pensar en procesos distintos, en donde RhoA puede estar cumpliendo funciones proinflamatorias mientras que SOCS puede estar llevando a cabo la respuesta antiinflamatoria durante la infección por ZIKV. En diversos estudios se ha visto que la participación de RhoA/ROCK está implicada en la modulación de otras vías importantes para la respuesta inmune, como lo es NF- κ B, en modelos experimentales de neuropatía, en donde la inhibición de RhoA/ROCK se relacionó con la disminución de la traslocación nuclear de NF- κ B, afectando la producción de FN, ICAM-1 y TGF- β 1 (Xie et al., 2013). A su vez, en otras GTPasas como Ral, mediante la regulación de Ciclina D1, se observó la activación de NF- κ B, dilucidando algunos de los mecanismos por los cuales puede ocurrir este proceso, donde converge la activación de la vía de mitógenos y de la supervivencia en fibroblastos (Henry et al., 2000). Por otra parte, la vía de señalización de las GTPasas se ha ligado con la respuesta inmune inflamatoria mediante la modulación de IRF-3 junto a la activación de Rac1 y PAK1 durante infecciones virales para montar la respuesta a Interferón (IFN), sin embargo, la inhibición de Rac1 provoca una pobre respuesta de IFN- $\alpha\beta$ (Ehrhardt et al., 2004). Además se ha reportado en infecciones por el virus de Theiler, que la inhibición de GTPasas como Ran por proteínas virales, altera de manera indirecta el exporte nuclear de RNAm, entre ellos de IRF-3, provocando una disminución de la respuesta antiviral (Ricour et al., 2009). Nuestros resultados indican una modulación de IRF-3 y NF- κ B durante la infección por ZIKV en cultivos

primarios. La proteína IRF-3 mostró una tendencia a la disminución a 48 y 72 hpi, mientras que NF- κ B disminuye a 48 hpi y tiene una tendencia a restablecerse, sin embargo, estos cambios no mostraron significancia estadística. La regulación negativa de IRF-3 puede estar generando una disminución de IFN- $\alpha\beta$, mientras que la modulación de NF- κ B puede estar alterando la producción de citocinas proinflamatorias, sugiriendo que RhoA puede jugar un papel importante durante la respuesta inflamatoria.

En este sentido, la inhibición específica de la vía de RhoA se relacionó con la disminución de la proteína NS5 de ZIKV a 24 hpi, sugiriendo que puede estar afectando la infección viral. Nuestros resultados correlacionan con los observado por Kalia et al., 2013, en donde si inhiben la vía de RhoA observan una disminución la entrada del virus de la Encefalitis Japonesa (*Flavivirus*) en células neuronales, indicando que la modulación del citoesqueleto juega un papel importante para la entrada del virus a la células. Además, otras GTPasas como Rac1 se han relacionado con la infección por el virus dengue, durante la remodelación del citoesqueleto y la formación de uniones estrechas en células endoteliales (Wang et al., 2010). Curiosamente, en nuestros ensayos de inhibición, pudimos notar una disminución importante de los niveles endógenos totales de RhoA, mismo que se podría relacionar con la disminución o degradación de los niveles totales de RhoA, al no estar activándose de manera normal en las células y durante la infección. La idea de la degradación de RhoA en su estado GDP, se ha descrito utilizando a la proteína FBXL19, que se une a RhoA en el citoplasma y la conduce a ubiquitinación y degradación (Wei et al., 2013). A su vez, la proteína de andamio CUL3, juega un papel importante para controlar la estructura y movilidad celular mediante al degradación de RhoA (Chen et al., 2009), lo que indica que RhoA puede ser regulada de manera postraduccional para mantener su niveles óptimos en la célula.

Una vez teniendo en cuenta que RhoA puede ser importante durante la

infección por ZIKV, se abordó su inhibición mediante el uso de fármacos aprobados por la FDA, mismos que poseen evidencia de su actividad antiviral e hipolipemiente, capaz de regular la prenilación de las GTPasas y por lo tanto alterando su activación (Farfan-Morales et al., 2021). Para abordar la estrategia farmacológica se utilizaron compuestos de la familia de las estatinas como, la simvastatina, la atorvastatina, la lovastatina y la metformina un antidiabético. Los fármacos que mostraron una modulación en los niveles de endógenos totales de RhoA fueron atorvastatina y metformina, mismos que en un contexto de infección indujeron una disminución de los niveles de expresión de la proteína NS5 del ZIKV. Por otra parte, la simvastatina y la lovastatina, no mostraron disminución en los niveles de RhoA, además de que simvastatina parecía aumentar la infección. Estos resultados refuerzan la idea de que RhoA se requiere durante las infecciones por ZIKV y su disminución puede afectar alguna etapa de la replicación viral. La disminución del colesterol por parte de los fármacos hipolipemiantes, pueden estar regulando los niveles endógenos totales de RhoA (Medina et al., 2012), teniendo en cuenta que el colesterol juega un papel importante durante las infecciones por *Flavivirus* como el ZIKV (Osuna-Ramos et al., 2018). Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo antiviral, representando una posible estrategia para el control de infecciones por ZIKV en el cerebro, aunque queda por determinar si atorvastatina y metformina podrían estar teniendo el mismo efecto *in vivo* que lo observado *in vitro*.

13. CONCLUSIÓN

La expresión selectiva de genes relacionados con la respuesta inmune denota que ZIKV hace de la célula blanco un nicho adecuado para su replicación. Una de las vías más importantes que se determinó que es regulada durante la infección fue la vía de señalización de RhoA, relacionada con la respuesta inmune y alteración de citoesqueleto. Nuestros resultados sugieren que pueden ser un blanco terapéutico importante para la replicación de ZIKV en el cerebro. Además de que su activación no está relacionada con la vía SOCS/VAV/RhoA en cerebro y este proceso podría ser más ambiguo involucrando una cascada de señalización mayor.

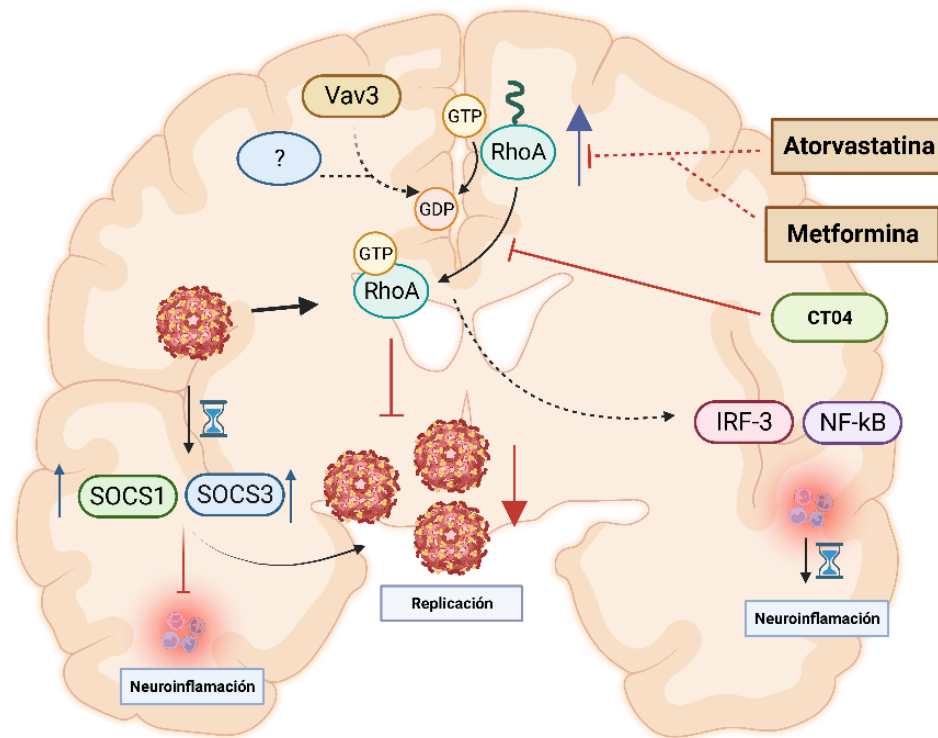


Figura 30. Modelo propuesto por el trabajo. La replicación de ZIKV en el cerebro provoca dos procesos importantes, el aumento de SOCS1/3 y la modulación de los niveles totales endógenos de RhoA. El aumento de SOCS1/3 sugiere que están mediando procesos antiinflamatorios, SOCS1 a tiempos tardíos de la infección, mientras que SOCS3 a tiempos tempranos. A su vez, la modulación de RhoA puede ser muy intrincada y quizás no dependiente de la activación por Vav3, por otra parte RhoA puede estar jugando un papel importante en la regulación de proteínas de la respuesta proinflamatoria como IRF-3 y NF-kB en donde la tendencia puede sugerir que a tiempos tardíos de la infección se están aumentando la produciendo proteínas proinflamatorias. Por otra parte, la inhibición de RhoA por CT04 y fármacos, sugiere que altera en algún punto la replicación viral.

14. BIBLIOGRAFÍA

- August, A., Gibson, S., Kawakami, Y., Kawakami, T., Mills, G. B., & Dupont, B. (1994). CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human Jurkat leukemic T-cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), 9347-9351. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9347>
- Baud, D., Gubler, D. J., Schaub, B., Lanteri, M. C., & Musso, D. (2017). An update on Zika virus infection. *The Lancet*, 390(10107), 2099-2109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31450-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31450-2)
- Bustelo, X. R. (2014). Vav family exchange factors: An integrated regulatory and functional view. *Small GTPases*, 5(2), e973757. <https://doi.org/10.4161/21541248.2014.973757>
- Cao, B., Diamond, M. S., & Mysorekar, I. U. (2017). Maternal-Fetal Transmission of Zika Virus: Routes and Signals for Infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 37(7), 287-294. <https://doi.org/10.1089/jir.2017.0011>
- Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.-L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S. K., Willison, H. J., Musset, L., Manuguerra, J.-C., Despres, P., Fournier, E., ... Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus

infection in French Polynesia: A case-control study. *The Lancet*, 387(10027), 1531-1539. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)

Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual review of immunology*, 35, 441-468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>

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>

De Sepulveda, P., Ilangumaran, S., & Rottapel, R. (2000). Suppressor of Cytokine Signaling-1 Inhibits VAV Function through Protein Degradation*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14005-14008. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000106200>

Ding, J., Li, Q.-Y., Wang, X., Sun, C.-H., Lu, C.-Z., & Xiao, B.-G. (2010). Fasudil protects hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury by suppressing microglial inflammatory responses in mice. *Journal of Neurochemistry*, 114(6), 1619-1629. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06876.x>

Faizan, M. I., Abdullah, M., Ali, S., Naqvi, I. H., Ahmed, A., & Parveen, S.

(2016). Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology*, 59(3), 152-158.

<https://doi.org/10.1159/000452950>

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>

Hodge, R. G., & Ridley, A. J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(8), 496-510.

<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>

Kim, J.-G., Islam, R., Cho, J. Y., Jeong, H., Cap, K.-C., Park, Y., Hossain, A. J., & Park, J.-B. (2018). Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6381-6392. <https://doi.org/10.1002/jcp.26487>

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>

Martinez Viedma, M. del P., & Pickett, B. E. (2018). Characterizing the

- Different Effects of Zika Virus Infection in Placenta and Microglia Cells. *Viruses*, 10(11), 649. <https://doi.org/10.3390/v10110649>
- Norbury, A. J., Jolly, L. A., Kris, L. P., & Carr, J. M. (2022). Vav Proteins in Development of the Brain: A Potential Relationship to the Pathogenesis of Congenital Zika Syndrome? *Viruses*, 14(2), 386. <https://doi.org/10.3390/v14020386>
- Organización Panamericana de la Salud. (2022). Síntesis de evidencia: Directrices para el diagnóstico y el tratamiento del dengue, el chikunguña y el zika en la Región de las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 46, e82. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2022.82>
- Reichova, A., Zatkova, M., Bacova, Z., & Bakos, J. (2018). Abnormalities in interactions of Rho GTPases with scaffolding proteins contribute to neurodevelopmental disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 96(5), 781-788. <https://doi.org/10.1002/jnr.24200>
- Seong, R.-K., Lee, J. K., & Shin, O. S. (2020). Zika Virus-Induction of the Suppressor of Cytokine Signaling 1/3 Contributes to the Modulation of Viral Replication. *Pathogens*, 9(3), 163. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030163>
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., & Stapleton, J. T. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 98(1), 2-3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>

- Song, E. H., Oh, W., Ulu, A., Carr, H. S., Zuo, Y., & Frost, J. A. (2015). Acetylation of the RhoA GEF Net1A controls its subcellular localization and activity. *Journal of Cell Science*, *128*(5), 913-922. <https://doi.org/10.1242/jcs.158121>
- Tamura, T., Igarashi, M., Enkhbold, B., Suzuki, T., Okamatsu, M., Ono, C., Mori, H., Izumi, T., Sato, A., Fauzyah, Y., Okamoto, T., Sakoda, Y., Fukuhara, T., & Matsuura, Y. (2019). In Vivo Dynamics of Reporter Flaviviridae Viruses. *Journal of Virology*, *93*(22), e01191-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01191-19>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1181-1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Xu, P., Shan, C., Dunn, T. J., Xie, X., Xia, H., Gao, J., Allende Labastida, J., Zou, J., Villarreal, P. P., Schlagal, C. R., Yu, Y., Vargas, G., Rossi, S. L., Vasilakis, N., Shi, P.-Y., Weaver, S. C., & Wu, P. (2020). Role of microglia in the dissemination of Zika virus from mother to fetal brain. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *14*(7), e0008413. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008413>
- Baud, D., Gubler, D. J., Schaub, B., Lanteri, M. C., & Musso, D. (2017). An update on Zika virus infection. *The Lancet*, *390*(10107), 2099-2109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31450-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31450-2)

Bhatnagar, J., Rabeneck, D. B., Martines, R. B., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Estetter, L. B. C., Suzuki, T., Ritter, J., Keating, M. K., Hale, G., Gary, J., Muehlenbachs, A., Lambert, A., Lanciotti, R., Oduyebo, T., Meaney-Delman, D., Bolaños, F., Saad, E. A. P., Shieh, W.-J., & Zaki, S. R. (2017). Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerging Infectious Diseases*, 23(3), 405-414.

<https://doi.org/10.3201/eid2303.161499>

Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., ... Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125-148.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>

Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Nogueira, R. M. R., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., Valderramos, S. G., Halai, U.-A., Salles, T. S., Zin, A. A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Gabaglia, C. R., de Sequeira, P. C., Pilotto, J. H., Medialdea-Carrera, R., da Cunha, D. C., ... Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England journal of medicine*, 375(24), 2321-2334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>

Bronstein, R., Torres, L., Nissen, J. C., & Tsirka, S. E. (2013). Culturing Microglia from the Neonatal and Adult Central Nervous System.

Journal of Visualized Experiments : JoVE, 78, 50647.

<https://doi.org/10.3791/50647>

Bustelo, X. R. (2014). Vav family exchange factors: An integrated regulatory and functional view. *Small GTPases*, 5(2), e973757.

<https://doi.org/10.4161/21541248.2014.973757>

Chen, Y., Yang, Z., Meng, M., Zhao, Y., Dong, N., Yan, H., Liu, L., Ding, M., Peng, H. B., & Shao, F. (2009). Cullin Mediates Degradation of RhoA through Evolutionarily Conserved BTB Adaptors to Control Actin Cytoskeleton Structure and Cell Movement. *Molecular Cell*, 35(6), 841-855. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.004>

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature protocols*, 1, 581-585.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>

Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*, 18(9), 2113-2123.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>

De Jesús-González, L. A., Palacios-Rápalo, S. N., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfán-Morales, C. N., Cordero-Rivera, C. D., Cisneros, B., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2022). Nucleo-

Cytoplasmic Transport of ZIKV Non-Structural 3 Protein Is Mediated by Importin- α/β and Exportin CRM-1. *Journal of Virology*, 97(1), e01773-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01773-22>

dos Santos, T., Rodriguez, A., Almiron, M., Sanhueza, A., Ramon, P., de Oliveira, W. K., Coelho, G. E., Badaró, R., Cortez, J., Ospina, M., Pimentel, R., Masis, R., Hernandez, F., Lara, B., Montoya, R., Jubithana, B., Melchor, A., Alvarez, A., Aldighieri, S., ... Espinal, M. A. (2016). Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome—Case Series from Seven Countries. *New England Journal of Medicine*, 375(16), 1598-1601. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1609015>

Ehrhardt, C., Kardinal, C., Wurzer, W. J., Wolff, T., von Eichel-Streiber, C., Pleschka, S., Planz, O., & Ludwig, S. (2004). Rac1 and PAK1 are upstream of IKK- ϵ and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Letters*, 567(2), 230-238. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.069>

Ghafouri-Fard, S., Oskooei, V. K., Azari, I., & Taheri, M. (2018). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) genes are downregulated in breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 16(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1529-9>

Guo, S., Wang, H., & Yin, Y. (2022). Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 815347. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>

- Henry, D. O., Moskalenko, S. A., Kaur, K. J., Fu, M., Pestell, R. G., Camonis, J. H., & White, M. A. (2000). Ral GTPases Contribute to Regulation of Cyclin D1 through Activation of NF- κ B. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), 8084-8092.
- Kalia, M., Khasa, R., Sharma, M., Nain, M., & Vрати, S. (2013). Japanese Encephalitis Virus Infects Neuronal Cells through a Clathrin-Independent Endocytic Mechanism. *Journal of Virology*, 87(1), 148-162. <https://doi.org/10.1128/JVI.01399-12>
- Luu, A. P., Yao, Z., Ramachandran, S., Azzopardi, S. A., Miles, L. A., Schneider, W. M., Hoffmann, H.-H., Bozzacco, L., Garcia, G., Gong, D., Damoiseaux, R., Tang, H., Morizono, K., Rudin, C. M., Sun, R., Arumugaswami, V., Poirier, J. T., MacDonald, M. R., Rice, C. M., & Li, M. M. H. (2021). A CRISPR Activation Screen Identifies an Atypical Rho GTPase That Enhances Zika Viral Entry. *Viruses*, 13(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/v13112113>
- Medina, M. W., Theusch, E., Naidoo, D., Bauzon, F., Stevens, K., Mangravite, L. M., Kuang, Y.-L., & Krauss, R. M. (2012). RHOA Is a Modulator of the Cholesterol-Lowering Effects of Statin. *PLoS Genetics*, 8(11), e1003058. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003058>
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M. L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., Couplier, M., Missé, D., Jouvenet, N., Tabibiazar, R., Gressens, P., Schwartz, O., & Amara, A. (2017). Axl Mediates ZIKA

Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*, 18(2), 324-333.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>

Mulherkar, S., & Tolias, K. F. (2020). RhoA-ROCK Signaling as a Therapeutic Target in Traumatic Brain Injury. *Cells*, 9(1), 245.

<https://doi.org/10.3390/cells9010245>

Murray, K. O., Gorchakov, R., Carlson, A. R., Berry, R., Lai, L., Natrajan, M., Garcia, M. N., Correa, A., Patel, S. M., Aagaard, K., & Mulligan, M. J. (2017). Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1), 99-101.

<https://doi.org/10.3201/eid2301.161394>

Nie, Y., Hui, L., Guo, M., Yang, W., Huang, R., Chen, J., Wen, X., Zhao, M., & Wu, Y. (2021). Rearrangement of Actin Cytoskeleton by Zika Virus Infection Facilitates Blood–Testis Barrier Hyperpermeability. *Virologica Sinica*, 36(4), 692-705. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00343-x>

Nobrega, G. M., Samogim, A. P., Parise, P. L., Venceslau, E. M., Guida, J. P. S., Japecanga, R. R., Amorim, M. R., Toledo-Teixeira, D. A., Forato, J., Consonni, S. R., Costa, M. L., Proenca-Modena, J. L., Amaral, E., Besteti Pires Mayer-Milanez, H. M., Ribeiro-do-Valle, C. C., Calil, R., Bennini Junior, J. R., Lajos, G. J., Altemani, A., ... Muraro, S. P. (2020). TAM and TIM receptors mRNA expression in Zika virus infected placentas. *Placenta*, 101, 204-207.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.09.062>

- Norbury, A. J., Jolly, L. A., Kris, L. P., & Carr, J. M. (2022). Vav Proteins in Development of the Brain: A Potential Relationship to the Pathogenesis of Congenital Zika Syndrome? *Viruses*, *14*(2), 386. <https://doi.org/10.3390/v14020386>
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Human Neural Stem Cells. *Cell stem cell*, *18*(5), 591-596. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.012>
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparac-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H. P., Musso, D., & Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, *19*(9). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>
- Onorati, M., Li, Z., Liu, F., Sousa, A. M. M., Nakagawa, N., Li, M., Dell'Anno, M. T., Gulden, F. O., Pochareddy, S., Tebbenkamp, A. T. N., Han, W., Pletikos, M., Gao, T., Zhu, Y., Bichsel, C., Varela, L., Szigeti-Buck, K., Lisgo, S., Zhang, Y., ... Sestan, N. (2016). Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Reports*, *16*(10), 2576-2592. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.038>
- Osuna-Ramos, J. F., Reyes-Ruiz, J. M., & del Ángel, R. M. (2018). The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. *Frontiers in Cellular and*

Infection Microbiology, 8, 388.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00388>

Quinn, K., Brindley, M. A., Weller, M. L., Kaludov, N., Kondratowicz, A., Hunt, C. L., Sinn, P. L., McCray, P. B., Stein, C. S., Davidson, B. L., Flick, R., Mandell, R., Staplin, W., Maury, W., & Chiorini, J. A. (2009). Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors. *Journal of Virology*, 83(19), 10176-10186.

<https://doi.org/10.1128/JVI.00422-09>

Ricour, C., Delhay, S., Hato, S. V., Olenyik, T. D., Michel, B., van Kuppeveld, F. J. M., Gustin, K. E., & Michiels, T. (2009). Inhibition of mRNA export and IRF-3 dimerization by Theiler's virus leader protein. *The Journal of general virology*, 90(Pt 1), 177-186.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.005678-0>

Rodrigues, L., Pires de Miranda, M., Caloca, M. J., Bustelo, X. R., & Simas, J. P. (2006). Activation of Vav by the Gammaherpesvirus M2 Protein Contributes to the Establishment of Viral Latency in B Lymphocytes. *Journal of Virology*, 80(12), 6123-6135.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02700-05>

Rodriguez, A. K., Muñoz, A. L., Segura, N. A., Rangel, H. R., & Bello, F. (2019). Molecular characteristics and replication mechanism of dengue, zika and chikungunya arboviruses, and their treatments with natural extracts from plants: An updated review. *EXCLI Journal*, 18, 988. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1825>

- Seong, R.-K., Lee, J. K., & Shin, O. S. (2020). Zika Virus-Induction of the Suppressor of Cytokine Signaling 1/3 Contributes to the Modulation of Viral Replication. *Pathogens*, 9(3), 163.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9030163>
- Shankar, A., Patil, A., & Skariyachan, S. (2017). Recent Perspectives on Genome, Transmission, Clinical Manifestation, Diagnosis, Therapeutic Strategies, Vaccine Developments, and Challenges of Zika Virus Research. *Frontiers in Microbiology*, 08.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01761>
- Swaminathan, S., Schlaberg, R., Lewis, J., Hanson, K. E., & Couturier, M. R. (2016). Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1907-1909.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc1610613>
- Wang, J.-L., Zhang, J.-L., Chen, W., Xu, X.-F., Gao, N., Fan, D.-Y., & An, J. (2010). Roles of Small GTPase Rac1 in the Regulation of Actin Cytoskeleton during Dengue Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), e809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000809>
- Wei, J., Mialki, R. K., Dong, S., Khoo, A., Mallampalli, R. K., Zhao, Y., & Zhao, J. (2013). A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: Roles of SCF(FBXL19) E3 ligase and Erk2. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(12), 2757-2764.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.005>

Wells, C. M., Bhavsar, P. J., Evans, I. R., Vigorito, E., Turner, M., Tybulewicz, V., & Ridley, A. J. (2005). Vav1 and Vav2 play different roles in macrophage migration and cytoskeletal organization. *Experimental Cell Research*, 310(2), 303-310.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.015>

Xie, X., Peng, J., Chang, X., Huang, K., Huang, J., Wang, S., Shen, X., Liu, P., & Huang, H. (2013). Activation of RhoA/ROCK regulates NF- κ B signaling pathway in experimental diabetic nephropathy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 369(1-2), 86-97.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.007>

World Health Organization. (2016). Zika Strategic Response Framework & Joint Operations Plan (January-June 2016).

SINAVE, 2023. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus del Zika. * Hasta el 23 de marzo de 2023.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/810642/CuadroCasosZikayEmb_SE10_2023.pdfWorld Health Organization. (2022). ZIKA epidemiology update (Global overview February 2022).

