



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**MODULACIÓN DE LA PERMISIBILIDAD DE INFECCIÓN POR ZIKV POR EL
SOBRENADANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE
PLACENTA (PDMSC)**

**ELABORADO POR:
ISBETH LAURIN**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2025**



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Modulación de la permisibilidad de infección por ZIKV por el sobrenadante de células madre mesenquimales derivadas de placenta (PDMSC)

Por:

Isbeth Laurin

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, para optar por el título de Licenciada en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología.

Asesora principal: Sandra López Vergès, PhD

Co-Asesoras: Leyda Ábrego, PhD

Mairim Solís, PhD

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“MODULACIÓN DE LA PERMISIBILIDAD DE INFECCIÓN POR ZIKV POR EL SOBRENADANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE PLACENTA (PDMSC)”

Por:

Isbeth Laurin
8-952-1088

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Sandra López Vergès, PhD

Leyda Ábrego, PhD

Mairim Solís, PhD

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza, salud y la sabiduría para recorrer este camino.

A mí, desde la gratitud, por sostener el compromiso de no rendirme y confiar en este sueño incluso cuando parecía distante. Este trabajo simboliza el resultado de una meta como crecimiento personal y académico que he logrado con determinación, esfuerzo y disciplina.

A mis padres, mi mayor pilar, porque todo lo que soy y he logrado tiene raíces es su amor, valores y esfuerzo para hacer posible mis estudios. Gracias por celebrar mis logros como propios, por enseñarme el valor del trabajo, esfuerzo y la perseverancia, por cada sacrificio silencioso, por cada palabra de aliento, por cada gesto de cuidado que me permitió llegar hasta aquí. Este logro también es suyo.

A mi hermano, por alentarme con admiración y cariño. Mi hermana, quien es mi principal motivación inspirándome siempre para dar lo mejor de mí.

A ti, que estuviste a mi lado siempre, celebrando mis logros y sosteniéndome en los momentos en que dudé. Gracias por tu paciencia, por tu fe constante en mí y por convertirme en un apoyo durante este recorrido.

A mis mentoras, por compartir sus conocimientos científicos conmigo y guiarme en cada paso para sacar con éxito esta investigación; gracias por hacer un espacio en sus tiempos para enseñarme, corregirme e impulsarme a continuar en mis próximas metas académicas.

AGRADECIMIENTOS

Culminar esta investigación científica para optar por mi título de licenciatura, ha representado un proceso de crecimiento intelectual y personal que no habría sido posible sin el apoyo de quienes me acompañaron en cada etapa. La virología se convirtió en un camino de descubrimiento que me exigió constancia, disciplina y compromiso, pero también me brindó la satisfacción de superar desafíos y alcanzar metas.

Extiendo mi gratitud a mis padres Ezequiel Laurin y Videlia Chirú, quienes han sido un pilar fundamental acompañándome en todo momento y celebrando conmigo cada logro. A la familia Martínez, por su cariño y buenos consejos.

A mis asesoras de tesis, Dra. Leyda Ábrego, Dra. Mairim Solís, en especial la Dra. Sandra López Vergès, gracias por su orientación, sus valiosas observaciones y el tiempo dedicado para transmitirme sus conocimientos, pasión y el rigor científico.

A mi compañera y mentora Dimelza Arauz, por su guía constante y valiosa enseñanza que me motivo en cada experimento.

A la Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Escuela de Biología; por brindarme el acceso de formación académica Institucional.

Agradezco al ICGES por brindarme sus instalaciones de laboratorio y equipos necesarios para desarrollar mi tesis en el Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología, como también a los miembros de su equipo, Liseth Sáenz, Isela Guerrero, Jim Chang y Brechla Moreno y al grupo de células madre dirigido por la Dra. Mairim Solís por su valiosa colaboración.

El desarrollo de este trabajo de tesis fue financiado gracias a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) con los fondos de los proyectos FID18-043 y MOV208-23, MEF Proyecto 18 (SLV) y Sistema Nacional de Investigación (SLV).

Este logro académico no es únicamente un reflejo de mi esfuerzo, sino también del acompañamiento y la confianza que estos depositaron en mí.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	12
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO I	17
MARCO TEÓRICO	17
VIRUS ZIKA (ZIKV)	18
Generalidades.....	18
Clasificación.....	19
Estructura y organización genómica	19
Replicación viral.....	22
Epidemiología	24
Casos epidemiológicos en Panamá.....	25
Patogénesis	29
Transmisión de la infección por ZIKV.....	30
Tipos de transmisión	31
Transmisión vectorial.....	31
Ecología e importancia de la transmisión vectorial	32
Transmisión no vectorial.....	32
Transmisión vertical e infección de la placenta	33
Rol de los microARN (miARN) en la placenta.....	36
Tratamiento	38
OBJETIVOS	40

Objetivo General	40
Objetivos específicos	40
HIPÓTESIS	40
CAPÍTULO II.....	41
METODOLOGÍA.....	41
Tipo de investigación	42
Diseño del estudio	42
Tipo de muestra.....	42
Medidas de bioseguridad	43
Materiales	43
Métodos.....	45
Cultivo de líneas celulares VERO y HEK-293T.....	45
Preparación de sobrenadantes de PDMSC y HEK 293T	48
Producción del virus Zika, en línea celular VERO.....	49
Inoculación con virus.....	49
Cosecha de virus.....	50
Titulación del virus.....	50
Efecto Citopático de ZIKV en células VERO y HEK-293T pretratados con sobrenadantes o no	51
Metodología molecular	53
Extracción de plásmido.....	53
Extracción de ARN viral	55
RT-qPCR en tiempo real.....	55
Table 1. Secuencias de primers y sondas secuencia utilizados en Real-Time RT-PCR Assay	56

Tabla 2. Mezcla de reacción utilizada para la detección de ZIKV por SYBR Green. .	57
Tabla 3. Ciclos de amplificación para la detección de ZIKV.....	57
Síntesis de cDNA.....	58
Muestras de ARN ZIKA en células JAR WT y JAR KO.....	58
Tabla 4. Ciclos de incubación para la síntesis de cADN para muestras de ARN ZIKA en células JAR WT y JAR KO.	58
RT-qPCR - kit ROCHE Lightcycler 480 SYBR green	59
Tabla 5. Preparación del superMix ROCHE Lightcycler 480 SYBR green	59
CAPÍTULO III.....	60
RESULTADOS.....	60
RESULTADOS.....	61
Cultivo celular	61
Producción y titulación del virus Zika	64
Efecto del pre-tratamiento con sobrenadante sobre la replicación viral de ZIKV en células VERO y HEK-293T	65
Efecto de ZIKV en células PDMSC.....	72
CAPITULO IV	74
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES.....	78
RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	91

ÍNDICE DE TABLAS

Table 1. Secuencias de primers y sondas secuencia utilizados en Real-Time RT-PCR Assay	56
Tabla 2. Mezcla de reacción utilizada para la detección de ZIKV por SYBR Green. 57	
Tabla 3. Ciclos de amplificación para la detección de ZIKV.....	57
Tabla 4. Ciclos de incubación para la síntesis de cADN para muestras de ARN ZIKA en células JAR WT y JAR KO.	58
Tabla 5. Preparación del superMix ROCHE Lightcycler 480 SYBR green	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del genoma de ZIKV y sus proteínas codificadas.	20
Figura 2. Esquema de la partícula viral ZIKV.....	21
Figura 3. Ciclo de replicación de ZIKV y mecanismos implicados en las interacciones virus-células hospederas.....	23
Figura 4. Número de casos confirmados de Zika.	27
Figura 5. Síndrome congénito asociado a la infección por virus Zika.	27
Tomada de: Departamento Nacional de Epidemiología/MINSA	27
Figura 6. Distribución geográfica de la transmisión autóctona inicial de ZIKV en Panamá.....	28
Figura 7. Síntomas de Zika.	29
Figura 8. Ciclos de transmisión de ZIKV	31
Figura 9. Presentación esquemática de la interfaz materno-fetal y la infección por ZIKV.	35
Figura 10. Esquema general de metodología experimental	45
Figura 11. Cultivo celular de PDMSC y Cepa de ZIKV	46
Figura 12. Cultivo celular primario	46
Figura 13. Esquema de metodología.....	47
Figura.14. Esquema de cultivo celular.....	48
Figura 15. Morfología y crecimiento celular.	63
Figura 16. Titulación de ZIKV.....	64
Figura 17. Efecto de sobrenadantes en células VERO.	67
Figura 18. Efecto de sobrenadantes en células HEK-293T.	69
Figura 19. Carga viral en células VERO infectadas por ZIKV a través del tiempo. ...	70
Figura 20. Carga viral en células HEK-293T infectadas por ZIKV a través del tiempo.	72
Figura 21. Análisis de la expresión del grupo C19MC de miARNs en células PDMSC infectadas con ZIKV.....	73
Figura 22. Curvas estándar de la gama de plásmido ZikPan.	93

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 22. Curvas estándar de la gama de plásmido ZikPan.	93
Figura 23. Concentración de ADN (ng/μL) de plásmido ZikPan	93
Figura 24. Cultivos de HEK-293T inoculados con ZIKV.....	94
Figura 25. Observación y toma de fotos del Efecto citopático de ZIKV.	95
Figura 26. Preparación automatizada de placas de extracción de ARN utilizando el sistema KingFisher Flex.	95
Figura 27. RT-PCR tiempo real	96
Figura 28. RT-qPCR en tiempo real para Intrón 7 del C19MC	97

RESUMEN

El Virus Zika (ZIKV) es un virus transmitido por artrópodos (arbovirus) del género Flavivirus, de ARN de sentido positivo y cadena simple de 11 Kb. Fue aislado por primera vez en 1947 de un mono macaco rhesus febril en el bosque Zika (Uganda). Puede ser transmitido a partir de dos tipos, la transmisión vectorial por medio de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, y no vectorial a través de sangre, orina relaciones sexuales y durante el embarazo, de una madre a su feto. La placenta humana tiene varias líneas de defensa contra las infecciones virales, entre ellas la respuesta inmune innata. El ZIKV es capaz de infectar las células de placenta, sin embargo, hemos observado una resistencia parcial a la infección por la línea celular placentaria JAR y las células madre mesenquimales derivadas de placenta (PDMSC). El objetivo de este estudio es determinar si el sobrenadante de las PDMSC también transfiere resistencia a la infección ZIKV en células VERO y HEK-293T, creando un estado antiviral, y si esto depende de la expresión del miRNA C19MC.

ZIKV indujo un efecto citopático en las células VERO y HEK-293T sin una diferencia significativa entre las células pre-incubadas con sobrenadante de PDMSC, VERO, HEK-293T, o medio. En conjunto, los resultados preliminares muestran que las células de placenta que no expresan C19MC, como las JAR KO y las PDMSC, no logran transmitir un efecto protector antiviral a otros tipos celulares, a pesar de que las mismas PDMSC tengan una resistencia parcial a la infección por ZIKV.

INTRODUCCIÓN

El virus del Zika (ZIKV) es un arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Su vector principal es el mosquito *Aedes aegypti*, el cual también es conocido por transmitir los virus del dengue (DENV) y chikungunya (CHIKV).

ZIKV fue detectado por primera vez en 1947 en monos macacos Rhesus, durante una rutina de vigilancia de fiebre amarilla en el bosque Zika, en Uganda, donde un año más tarde fue aislado de un pool de mosquitos *Aedes africanus* (DICK *et al.* 1952). La primera enfermedad humana relacionada con ZIKV se informó en 1954 en Nigeria (MACNAMARA 1954). La actividad enzoótica de ZIKV, entre mosquitos y primates no humanos, fue observada posteriormente en diversas ocasiones en diferentes regiones de África y Asia, pero solo se reportaron 14 casos humanos hasta el 2007 (FAYE *et al.* 2014), cuando se registró el primer brote importante de ZIKV en la Isla de Yap (Micronesia), que afectó al 73% de los residentes mayores de 3 años (DUFFY *et al.* 2009). Más tarde, en el 2013, se desencadenó una gran epidemia en la Polinesia Francesa con alrededor de 30 000 casos sintomáticos que incluyeron fiebre baja, erupción maculopapular, artralgia y conjuntivitis (MUSSO *et al.* 2014).

Durante la epidemia del virus del Zika entre 2015 y 2016, se demostró por primera vez la transmisión vertical del ZIKV de madre a feto, un hallazgo que generó una alerta global de salud pública. El impacto fue especialmente grave en Brasil, sin embargo, también afectó a otras regiones de las Américas, donde se registraron miles de casos de síndrome congénito asociado al ZIKV, incluyendo microcefalia y otras anomalías neurológicas (Brasil, *et al.*, 2016). En Panamá, 278 embarazadas fueron sospechosas por infección por ZIKV, 97 fueron confirmadas, mientras que 31 neonatos con malformaciones congénitas han sido asociados con la infección por este virus, de los cuales se reportó el fallecimiento de 3 (Cerezo, *et al.*, 2018). Desde finales del 2018, el número de casos reportados ha disminuido en Panamá y en la región Latinoamericana, sin embargo, es indispensable darle un seguimiento a los reportes del virus por diversas razones, de las cuales podemos mencionar que el 80% de los casos infectados pueden ser asintomáticos y se desconoce qué rol juegan en la transmisión del virus (Mouillet, *et al.*, 2014). Además, ZIKV se detecta en algunos

fluidos como el semen por varios meses y se desconoce la carga viral mínima necesaria para la transmisión sexual (Musso, *et al.*, 2015). Existe el riesgo de nuevas epidemias en el futuro por otros genotipos de ZIKV, ya que se desconoce la inmunoresistencia de la población a largo plazo (Mansuy, *et al.*, 2016). En Panamá circula el virus del Dengue (DENV), otro flavivirus que es endémico, y estudios recientes muestran que infecciones previas entre DENV y ZIKV pueden aumentar los riesgos de manifestaciones graves (Kozak, *et al.*, 2017). Estos argumentos evidencian que, Panamá debido a su ubicación geográfica, su rol internacional y la persistencia de los vectores del virus, debe seguir investigando el ZIKV al igual que otros arbovirus con el fin de prepararse ante eventuales brotes y epidemias.

La epidemia de ZIKV en las Américas tuvo un gran impacto en salud pública ya que además del vectorial, se han descrito otros modos de transmisión como de la madre al feto durante el embarazo, contacto sexual, transfusión de sangre y productos sanguíneos y el trasplante de órganos (Musso, *et al.*, 2015; Mansuy, *et al.*, 2016). En consecuencia, ZIKV es el causante de no solo la infección febril en pacientes infectados, sino también se ha comprobado su asociación a síndromes neurológicos, casos de microcefalia y malformaciones congénitas en fetos y neonatos de embarazadas infectadas por ZIKV (síndrome congénital por ZIKV) (Oliveira, *et al.*, 2016; Parra, *et al.*, 2016). El ZIKV ha sido detectado en el fluido amniótico de mujeres embarazadas y en tejido de placenta de mujeres que tuvieron bebés con microcefalia, igualmente en el tejido cerebral de feto (específicamente en las células gliales y en algunas células endoteliales). Esto indica que ZIKV cruza la placenta y causa microcefalia al infectar a células corticales progenitoras, induciendo la muerte de la célula por apoptosis y autofagia (Fauci AS., 2016).

Por estas razones, es necesario entender la interacción entre el ZIKV y las células de placenta. Hemos demostrado en experimentos preliminares (Martin H, Chin Y, *et al.*, data no publicada), que las líneas celulares de placenta JAR WT tienen una resistencia a la infección por ZIKV, siendo menos susceptibles a este virus que otras células permisibles como las VERO, y que esta resistencia antiviral depende en parte de los miARN del grupo C19MC. Estudios previos muestran que las embarazadas en primer trimestre tienen el riesgo más alto de infección transplacentaria y esta disminuye con

el tiempo de embarazo, siendo mucho menor en el tercer trimestre (Luo, *et al.*, 2009; Donker, *et al.*, 2012). Como las células de placenta secretan moléculas, citocinas y vesículas extracelulares en su medio sobrenadante para comunicarse con otras células (Adibi, *et al.*, 2016), verificamos que las células primarias, células madre mesenquimales derivadas de la placenta (PDMSC, por sus siglas en inglés) que provienen de placentas de final de tercer trimestre tienen también una resistencia antiviral contra Zika (Araúz D *et al.*, data no publicada). Por ende, hicimos la hipótesis que la actividad antiviral de las células de placenta puede transferirse a otras células susceptibles a través de su sobrenadante, protegiéndolas, por lo menos parcialmente, de la infección por ZIKV. Para probar esta hipótesis, deseamos desarrollar en esta tesis un modelo *in vitro* utilizando como modelo de células primarias, PDMSC provenientes de placentas primarias de final de tercer trimestre (al momento del parto a término), en el cual analizaremos la capacidad de sobrenadantes de estas, y de un control de línea celular humana de fibroblastos (HEK-293T), de proteger de la infección por ZIKV a las células susceptibles (VERO y HEK-293T). De tener el sobrenadante de PDMSC actividad antiviral protectora, este estudio inicial permitirá en estudios futuros identificar posibles moléculas antivirales para tratamientos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

VIRUS ZIKA (ZIKV)

Generalidades

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, estrechamente relacionado con varios otros virus que causan enfermedades a nivel mundial, incluyendo Dengue (DENV), Fiebre Amarilla (YFV), Nilo Occidental (WNV), Encefalitis Japonesa (JEV) y el Virus de la Encefalitis Transmitida por garrapatas (TBEV) (Alam *et al.*, 2017; Miner *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). ZIKV se aisló por primera vez en 1947 de un mono macaco rhesus y de mosquitos provenientes del bosque de Zika, en Uganda (África).

Las infecciones por ZIKV en humanos fueron esporádicas durante medio siglo antes de emerger en el Pacífico y las Américas entre el 2007 y 2013 y en Brasil en el 2015 (Musso D, *et al.*, 2016).

Debido a una presentación clínica no específica, el ZIKV puede diagnosticarse erróneamente como otras enfermedades por arbovirosis como el dengue y el chikungunya. Esta fue asociada como una enfermedad leve antes del gran brote de la Polinesia Francesa entre 2013 y 2014 en el que se informaron complicaciones neurológicas graves (Nhan TX *et al.*, 2015).

Esta investigación se centra en el efecto del ZIKV sobre la transmisión vertical, la cual se ha detectado en diversos estudios mediante la detección del ARN del ZIKV en los tejidos cerebrales de los fetos abortados y los tejidos placentarios, así como el aumento del número de defectos del neurodesarrollo neonatal durante el brote de ZIKV (Bhatnagar J *et al.*, 2017). La identificación de los tipos de células infectadas con ZIKV, así como una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares utilizados por el ZIKV para atravesar la placenta son particularmente importantes para prevenir la transmisión viral al feto, así como para mejorar el pronóstico fetal y los resultados adversos del embarazo. Por lo tanto, una mejor comprensión de la patogénesis del ZIKV durante el embarazo puede guiar el diseño y/o desarrollo de agentes terapéuticos contra el ZIKV.

Clasificación

Taxonómicamente, el ZIKV se ha clasificado como miembro del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. ZIKV fue aislado inicialmente en 1947 de un mono macaco rhesus utilizado como centinela para detectar el virus de la fiebre amarilla (YFV) en el bosque Zika, en Uganda. El virus posteriormente fue aislado en 1948 de *Aedes africanus*, también del bosque Zika (Dick GW, *et al.*, 1952).

Estructura y organización genómica

La estructura del ZIKV está conformada por una partícula envuelta e icosaédrica de 50 nm con un genoma de ARN monocatenario de cadena positiva de 11 kb que contiene una región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) en las extremidades 5' y 3' (Martínez, J.D., *et al.*, Garza, 2019) (Figura 1).

Durante la traducción en el citoplasma de la célula hospedera, el ARN viral es traducido como una sola poliproteína larga, la cual posteriormente es clivada por proteasas virales (NS2B/NS3) y celulares (como la signal peptidase del retículo endoplásmico) (Figura 1) en sitios específicos (Lin *et al.*, 2018). Las partículas virales de ZIKV codifican tres proteínas estructurales (precursor de membrana prM, glicoproteína de envoltura E y núcleo C) (Figura 2), que desempeñan un papel fundamental en la asistencia a la patogénesis viral, propagación mediante la mediación de la entrada viral, promoción de la traducción viral y la replicación (Lin *et al.*, 2018; Routhu, N.K *et al.*, 2017).

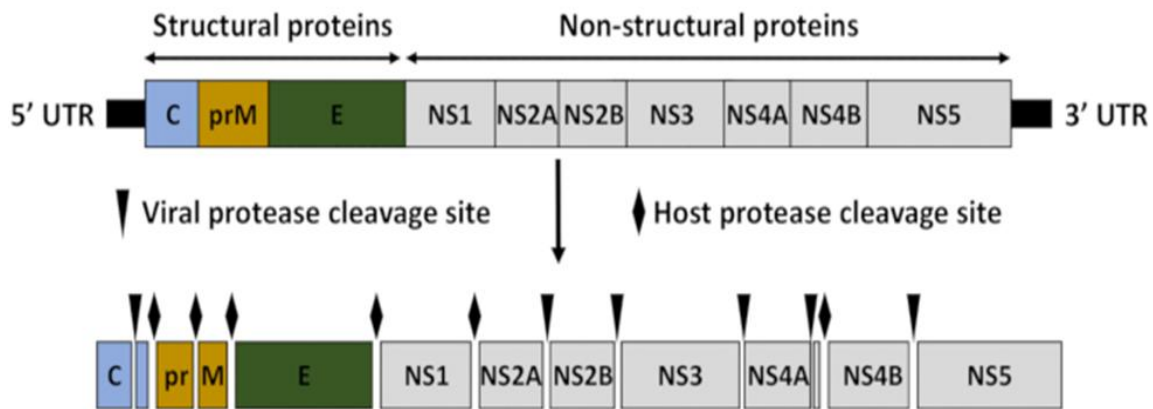


Figura 1. Estructura del genoma de ZIKV y sus proteínas codificadas.

Tomado de: Tan, T.Y., Fibrianah, *et al.*, 2020.

El genoma de ARN viral de ZIKV codifica tres proteínas estructurales (C, prM, E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5).

Es importante resaltar de igual manera que las proteínas no estructurales son responsables de la replicación y el ensamblaje viral.

Este procesamiento da lugar a la generación de las proteínas estructurales (C, prM/M, E) localizadas en el extremo 5' del genoma, y las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que participan en la replicación viral y el ensamblaje, localizadas hacia el extremo 3' (Musso, D., *et al.*, Gubler, D. J., 2018) (Figura 1).

La proteína envoltante (E), que media la entrada viral, de ZIKV posee una región de bucle de fusión altamente conservada que también se encuentra en WNV, YFV y DENV1-4. Como resultado, el bucle de fusión sirve como objetivo para los anticuerpos generados contra una amplia gama de flavivirus como DENV y ZIKV (Alcón, S.; Talarmin, A.; Debruyne, M.; *et al.*, 2002). Además, la detección de la mutagénesis por transposón ha demostrado la capacidad del ZIKV para tolerar la diversidad genética, como se desprende de la tolerancia de las mutaciones de los genes E del ZIKV, y esta flexibilidad genética dentro de un genoma viral tiene implicaciones importantes en los

mecanismos de evasión de la inmunidad adaptativa (Leier, *et al.*, 2018; Scaramozzino *et al.*, 2001; Wikan y Smith, 2016).

La NS1 flaviviral está involucrada en la replicación viral y la infección, e interactúa con los factores inmunes del huésped cuando se secreta extracelularmente para la evasión inmune y la patogénesis. Además, NS1 se ha sugerido como un biomarcador en el diagnóstico de flavivirus como el DENV, ya que se detecta altos niveles de secreción de NS1 en etapas tempranas de infección. NS3 consiste en un dominio de proteasa, que está vinculado a NS2B para formar un complejo de proteasa en el caso de ZIKV, y un dominio de helicasa. Como la proteína más grande y conservada del género flavivirus, NS5 juega un papel importante en la replicación viral. ZIKV NS5 contiene un dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), que es esencial para la replicación viral, y un dominio metiltransferasa (MTasa), que participa en la traducción y evasión de la respuesta inmune del huésped.

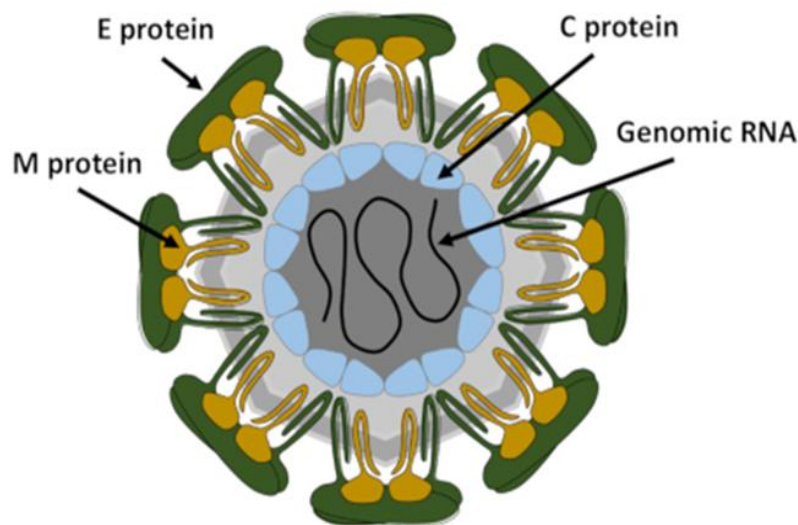


Figura 2. Esquema de la partícula viral ZIKV.

Tomado de: Tan, T.Y., Fibrianah, *et al.*, 2020. El genoma de ZIKV se encuentra dentro de una nucleocápside, que no tiene forma de icosaedro (como la de otros virus del género Flavivirus). La cápside externa está formada por la proteína estructural E. La proteína de la cápside C se pone

en contacto con un dímero formado por las proteínas E y M. Devika Sirohi, *et al.*, 2016.

Replicación viral

La replicación viral desencadena una respuesta inmune antiviral innata con producción de interferón de tipo 1. El resultado de la infección está dado por la competencia entre la replicación viral y la respuesta inmune del hospedero (Shah *et al.*, 2018). Uno de los aspectos más importantes es que estos virus tienen la capacidad de replicarse en dos huéspedes distintos, lo cual implica que pueden multiplicarse en células de vertebrados a una temperatura de entre 35 a 37 °C y en células de artrópodos a una temperatura de entre 26 a 28 °C (Garcia-Blanco *et al.*, 2016).

Para llevarse a cabo el ciclo replicativo del virus del Zika a la célula hospedera se debe dar la unión, este proceso está mediado por una o más moléculas localizadas en la superficie de la célula de vertebrado o de mosquito, la cual interacciona con una molécula de la superficie del virus.

La primera interacción entre el virus y la célula dispara una serie de señales que llevan a la internalización de la partícula viral por medio de vesículas llamadas endosomas (Li *et al.*, 2017).

La reducción en el pH de las endosomas (**1**, Figura 3) permite que las partículas virales se desensamblan y el material genético sea liberado al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el ARN viral tiene que llevar a cabo dos procesos importantes: el primero es su traducción (**3**, Figura 3) y el otro es su replicación. La traducción del material genético del virus permite la síntesis de las proteínas virales. (**5**, Figura 3). Éstas se clasifican en dos tipos: las estructurales, que son las encargadas de formar las nuevas partículas virales, y las no estructurales, las cuales participan en la multiplicación del material genético viral (A. Li *et al.*, 2018). Una vez que se ha generado suficiente proteína el siguiente paso es la replicación del virus. Este proceso de replicación requiere de hacer muchas copias de ARN a partir del ARN viral que entró a la célula. Cuando hay suficiente ARN y proteínas virales, se inicia el proceso de morfogénesis, en el cual las proteínas estructurales se asocian al ARN viral para formar los nuevos virus, que pueden ser liberados de la célula mediante dos mecanismos: por un lado, por la destrucción de la células o lisis, o bien por medio de vesículas exocíticas o de

salida. La salida por lisis lleva a la muerte de la célula infectada, mientras que durante la salida por vesículas exocíticas la muerte celular no ocurre. Los nuevos virus que salen de la célula pueden ahora infectar a células aledañas. Un elemento importante para considerar es que por cada virus que infecta a una célula se producen de 100 a 10000 nuevos virus, dependiendo del virus en cuestión, lo que habla de su gran capacidad de multiplicarse. Esta alta tasa de crecimiento es una gran ventaja para su proliferación, sin embargo, también puede ser un importante riesgo en el control de una infección.

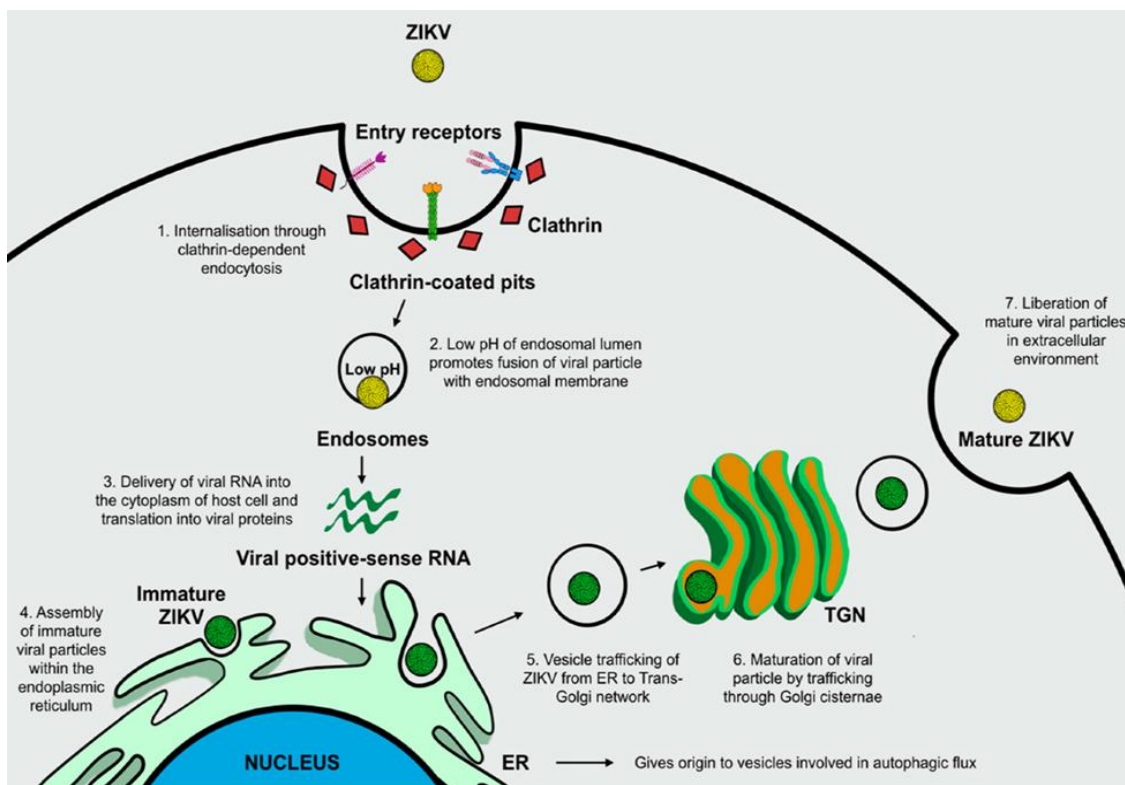


Figura 3. Ciclo de replicación de ZIKV y mecanismos implicados en las interacciones virus-células hospederas.

Tomada de: Gratton R, *et al.*, 2019.

La unión de las glicoproteínas estructurales de ZIKV a los receptores de entrada celular desencadena la internalización viral a través de la endocitosis dependiente de clatrina (1, Figura 3). El pH ácido endosómico induce cambios conformacionales de las glicoproteínas de la superficie viral, lo que permite la fusión de la envoltura viral

con la membrana endosómica, causando la liberación de ARN viral en el citosol **(2)**. El ARN viral se traduce en proteínas virales **(3)**. Las partículas virales inmaduras se ensamblan dentro del retículo endoplásmico (ER) **(4)**, y el tráfico de vesículas permite la transición de ZIKV de la ER a la red Golgi **(5)**. ZIKV luego pasa a través de las cisternas del aparato de Golgi, gracias a una proteasa celular llamada furina, que actúa en el aparato de Golgi y cliva la proteína prM viral en la proteína M madura, Este es un paso esencial para la maduración del virus y su infectividad. **(6)**. Las partículas de ZIKV maduras se suministran y liberan en el entorno extracelular **(7)**. (Shiryaev, S. A.*et al.*, 2017).

Epidemiología

El primer aislamiento de ZIKV se realizó en abril de 1947 a partir del suero de un mono rhesus pirexial en el dosel del bosque Zika, Uganda (G.W. Dick, *et al.*, 1952). Los primeros casos humanos se detectaron en Uganda y la República Unida de Tanzania en 1952, donde se detectaron anticuerpos neutralizantes contra el virus del Zika en sueros. En 1954, el virus fue aislado de una niña en el este de Nigeria (F.N. Macnamara, 1954). Desde la década de 1960 hasta la década de 1980, el virus del Zika se detectó en mosquitos y monos rhesus centinela en países de África ecuatorial. En 1969, el ZIKV amplió su distribución geográfica en Asia ecuatorial, donde se describe el primer gran brote en humanos en la isla de Yap en el Pacífico, en los Estados Federados de Micronesia. Se estima que el 73% de los residentes de Yap mayores de tres años estaban infectados con ZIKV. No se reportaron muertes, hospitalizaciones o complicaciones neurológicas (Duffy, *et al.*, 2009).

De 2012 a 2014, el ZIKV causó brotes en la Polinesia Francesa, Isla de Pascua, Islas Cook y Nueva Caledonia. Mientras tanto, el virus continuó circulando en Camboya, Malasia, Tailandia, Nigeria, Senegal y Uganda (Delatorre *et al.*, 2018).

Para marzo de 2015, se detectó una enfermedad caracterizada por una erupción cutánea en el norte de Brasil, sin embargo, no fue hasta mayo cuando se confirmó la infección por el virus Zika. En julio, Brasil informó casos de Zika confirmados por laboratorio en doce estados. En octubre de 2015, Colombia reportó pacientes confirmados por PCR con infecciones por ZIKV adquiridas localmente.

El virus Zika se limitó a Brasil y Colombia hasta noviembre de 2015, cuando se propagó a Surinam, Guatemala, México, El Salvador, Paraguay y Venezuela. En diciembre, Panamá reportó sus primeros casos confirmados, así como Haití, Puerto Rico, Martinica, Honduras y Guayana Francesa (M.K. Kindhauser, *et al.*, 2016).

En enero de 2016, Bolivia y San Martín detectaron sus primeros casos de Zika, así como Barbados, Islas Vírgenes, República Dominicana, Nicaragua y Jamaica. Al 28 de abril de 2016, los nuevos países con transmisiones locales confirmadas son: Curazao, Costa Rica, República de Trinidad y Tobago, Aruba, Bonaire, Saint Maarten, San Vicente y las Granadinas, Dominica, Cuba, Santa Lucía y Belice. Esto hace un total de 35 países/territorios con transmisión continua del virus autóctono y 7982 casos confirmados acumulados (Organización Panamericana de la Salud, casos acumulados sospechosos y confirmados reportados por países y territorios en las Américas (2015–2016).

Casos epidemiológicos en Panamá

Los primeros casos clínicos de infección por ZIKV se notificaron en América del Sur continental en 2015, poco después el virus se propagó rápidamente por América. Debido a las enfermedades febriles registradas, se iniciaron investigaciones con los casos clínicos que se estaban reportando en Panamá para su posible asociación con el virus Zika, dengue o chikungunya; estas enfermedades ocurrieron en la región de Guna Yala en el este de Panamá, que limita con el norte de Colombia. Se recopilaron y analizaron 276 muestras de suero y 26 muestras de orina pareadas de 276 pacientes que buscaron atención en clínicas en Guna Yala durante el 27 de noviembre de 2015 y el 22 de enero de 2016, y que además presentaban síntomas asociados a la enfermedad febril con menos de 5 días de duración, fecha de inicio de la enfermedad, edad, sexo, residencia y estado de embarazo autoinformado. Se pudo detectar ARN de ZIKV mediante rRT-PCR y IgM mediante ELISA en el 19% de 155 pacientes con sospecha de infección por el virus Zika, del cual más de 1 muestra que dio positivo para el virus Zika. (Araúz D, *et al.*, 2016).

Del mismo modo el Ministerio de Salud de Panamá (MINSa) realizó estudios en la semana epidemiológica No. 31 (Figura 4, 6) se examinaron más de 1650 muestras en

1607 casos; resultando positivas 39 en el 2015 y en el 2016 confirmadas 265, de las cuales 264 fueron diagnosticados en Panamá, de estos son autóctonos 264 casos, 37 importados y 5 quedaron pendiente de determinar. Los tipos de muestras que se examinaron fueron suero, tejidos, semen, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y orina. En Panamá, 97 embarazadas fueron confirmadas por infección por ZIKV (Cerezo, *et al.*, 2018), 85 por detección del genoma viral por biología molecular y/o aislamiento viral y 12 por serología IgM de ZIKV en el ICGES; mientras que se confirmaron 17 casos del síndrome congénito asociado a ZIKV (Pan American Health Organization/WorldHealth Organization. Washington, 2018).

El síndrome congénito asociado a la infección por ZIKV Se ha captado a la fecha en 33 casos sospechosos de los cuales han resultado 5 positivos a virus Zika (con madres positivas 2 y madres negativas 3). Además, se ha evidenciado 2 malformaciones visibles con resultado negativo y madres positivas durante el embarazo (Figura 5). Por ende, es necesario entender el mecanismo de transmisión materno-fetal y qué determina el desenlace de la infección, los países y regiones donde se está produciendo la transmisión autóctona de ZIKV y países donde se reportaron casos de síndrome de Guillain–Barré, así como casos confirmados de microcefalia (Figura 5).

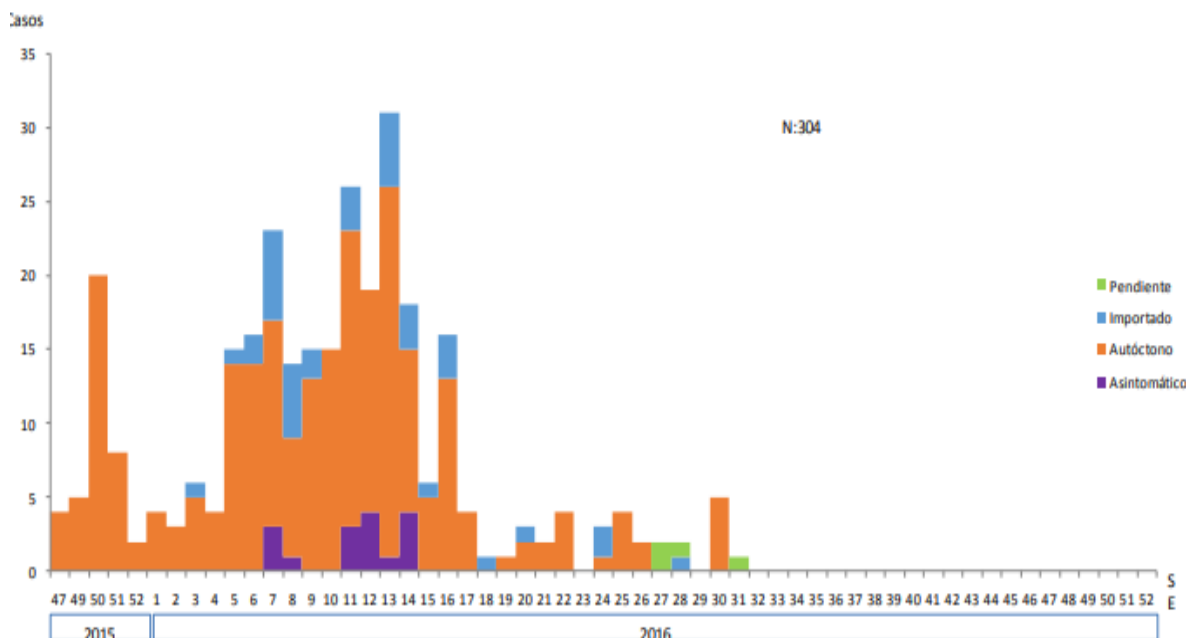


Figura 4. Número de casos confirmados de Zika. Casos registrados por laboratorio según semanas epidemiológicas, República de Panamá, Año 2015(sem 47)-2016(sem 31). Tomada de: Departamento Nacional de Epidemiología/MINSA.

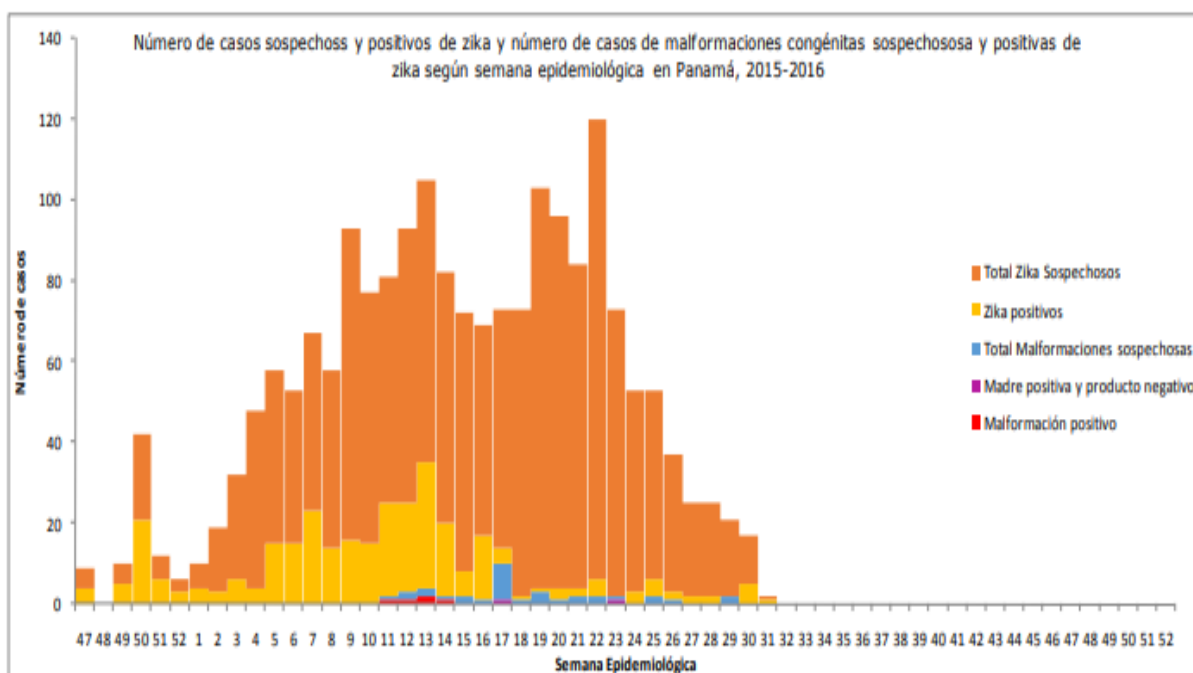


Figura 5. Síndrome congénito asociado a la infección por virus Zika.

Tomada de: Departamento Nacional de Epidemiología/MINSA

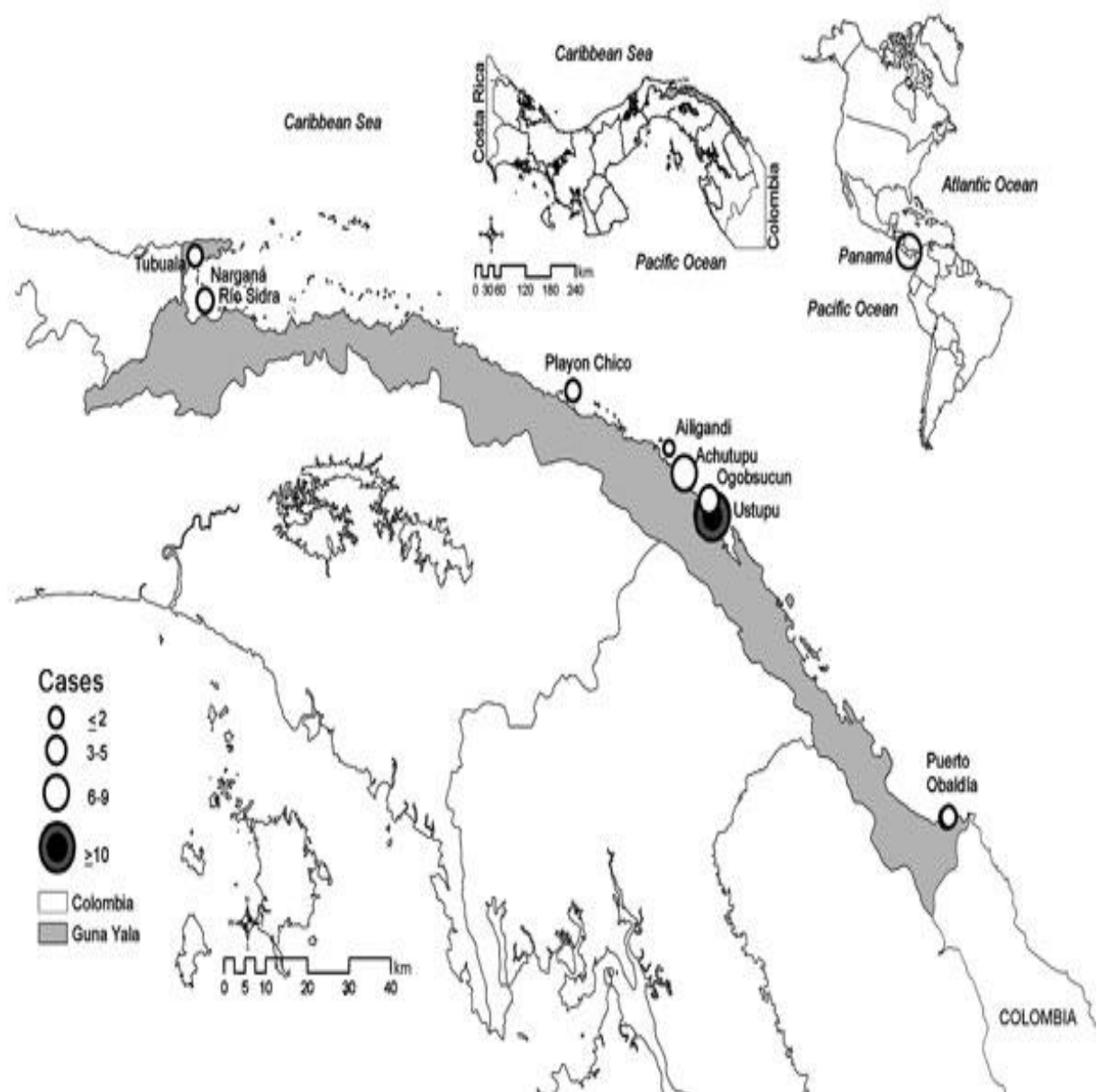


Figura 6. Distribución geográfica de la transmisión autóctona inicial de ZIKV en Panamá.

Tomada de: Araúz D, *et al.*, 2016.

Ubicaciones en la región de Guna Yala en el este de Panamá con casos confirmados de infección por el virus Zika durante el 27 de noviembre de 2015 y 22 de enero de 2016. Los mapas insertados muestran las ubicaciones de Guna Yala en Panamá y de Panamá en las Américas.

Patogénesis

A pesar de que muchas personas infectadas con el ZIKV no presentan síntomas, algunos manifiestan de manera leve una enfermedad febril similar al dengue. Los síntomas más comunes del Zika incluyen fiebre, erupción, dolor de cabeza, dolor en las articulaciones, ojos rojos y dolor muscular (Figura 7). Estos síntomas pueden durar desde varios días hasta una semana (Giraldo MI, *et al.*, 2022). La patogenicidad de ZIKV para los fetos es un aspecto importante e inusual para un flavivirus, ya que puede causar complicaciones neurológicas como el síndrome de Guillain-Barré. Si bien hay una serie de virus teratogénicos, los flavivirus generalmente no atraviesan la placenta ni causan enfermedades en el feto humano en desarrollo, como sí es el caso para ZIKV, especialmente durante el primer trimestre del embarazo. Hasta el 2022, 40 países y territorios, entre ellos se encuentran Brasil, Cabo Verde, Colombia, Polinesia Francesa, Martinica y Panamá, notificaron casos 2,439 de microcefalia potencialmente asociados con la infección por ZIKV (OMS 2022).

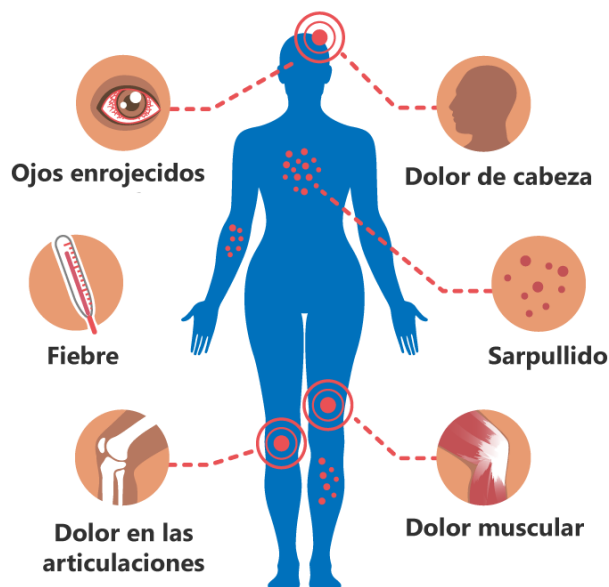


Figura 7. Síntomas de Zika. Una de cada cuatro personas infectadas puede desarrollar síntomas, pero en quienes sí son afectados, la enfermedad es usualmente leve, con síntomas que pueden durar entre 2 y 7 días. La apariencia clínica es muchas veces similar a la del dengue o chikunguña, que también se transmite por el mismo mosquito. Tomada de: Pan American Health Organization (PAHO) 2022.

Una revisión retrospectiva identificó 19 casos, incluidos ocho con lesiones cerebrales importantes y microcefalia grave, seis con lesiones cerebrales graves sin microcefalia y cinco con disfunción del tronco encefálico sin malformaciones visibles, de estos últimos los cinco casos mencionados de microcefalia comprobados, se detectó ARN viral mediante RT-PCR y se obtuvieron aislados infecciosos de ZIKV en cuatro (OMS, OPS 2016-2022).

Una serie de casos de mujeres embarazadas en Estados Unidos que viajaron a las áreas afectadas por el ZIKV informaron que la infección durante el embarazo se asoció con una variedad de resultados, incluidas las pérdidas tempranas del embarazo, la microcefalia congénita y los bebés aparentemente sanos. Además, se detectó ARN viral en restos fetales de pérdida temprana del embarazo, líquido de amniocentesis y placenta (Rubin, E. J. *et al.*, 2016).

Transmisión de la infección por ZIKV

El ZIKV puede propagarse por mosquitos infectados en un hábitat selvático a monos rhesus y viceversa, en un ciclo enzoótico entre primates no humanos. Por lo tanto, el mosquito vector, después de una picadura infecta a los humanos (Figura 8) en áreas rurales o urbanas en un ciclo epidémico. Este ciclo epidémico generalmente comienza cuando los humanos son infectados por los mosquitos infectados. Hasta la fecha, no se sabe si el ZIKV puede ser transmitido por mosquitos entre animales domésticos y humanos, y si el virus Zika también puede transmitirse sexualmente entre primates no humanos (monos) (Basu y Tumban, 2016).

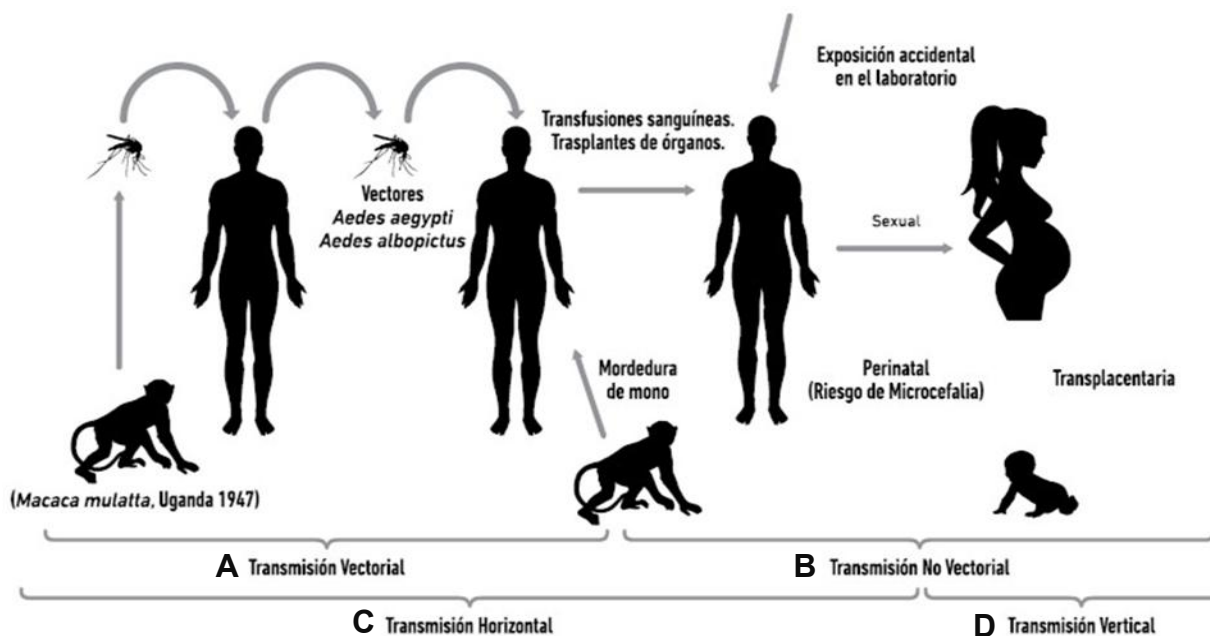


Figura 8. Ciclos de transmisión de ZIKV

Tomada de: Rodríguez-Morales *et al.* 2016.

Los ciclos transmitidos por vectores comprenden un ciclo selvático con una circulación viral entre primates no humanos y mosquitos zoófilos, y un ciclo urbano con humanos como reservorios y huéspedes de amplificación y mosquitos antropofílicos como vectores. El modo no vectorial implica la transmisión directa de persona a persona mediante contactos de fluidos (Herrera *et al.*, 2017; Roiz *et al.*, 2018).

Tipos de transmisión

Transmisión vectorial

El virus Zika se transmite principalmente a las personas a través de la picadura de un mosquito infectado del género *Aedes* (A Figura 8), incluyendo *Aedes aegypti* en regiones tropicales y subtropicales y *Aedes albopictus* en regiones templadas. Algunos de los vectores prevalentes identificados en África incluyen *Ae. luteocéfalo*, *Ae. africanus*, y *Ae. furcifer*. Sin embargo, la especie dominante varía considerablemente dependiendo de la ubicación del muestreo. Curiosamente, la participación de *Ae. aegypti* ha sido pequeña en África (J.P. Boorman, J. S. Porterfield, 1956), pero ha sido el vector más importante en el sudeste de Asia y el Pacífico. En el brote en la isla de Yap en el Pacífico, *Ae. hensilli* fue implicado como un posible vector (R.M. Duffy, *et al.*,

2009). *Ae. albopictus* también es susceptible a la infección y capaz de transmitir ZIKV. La mayor preocupación es que *Ae. albopictus* se ha encontrado en climas templados donde *Ae. aegypti* está ausente, permitiendo la transmisión de virus en esas regiones. Esto incluye 37 de los 48 estados contiguos de los Estados Unidos de América, Albania, Bulgaria, Croacia, Francia del Sur, Grecia, Italia, Malta, Montenegro, Eslovenia, España Oriental y Suiza del Sur (CDC, 2016).

Ecología e importancia de la transmisión vectorial

El virus del Zika surgió de su ciclo selvático en África y Asia a un hábitat rural en el 2007, cuando se detectó se reconoció la enfermedad en la isla de Yap, Micronesia, dónde la especie de mosquito *Aedes* fue el responsable de la transmisión (Duffy SR, Chen TH, Hancock WT, *et al.* 2009).

La rápida expansión del ZIKV en las Américas se ha debido en gran medida a la biología y el comportamiento de su vector, *Aedes aegypti*. Otros arbovirus transmitidos por *Ae. aegypti* incluyen otros flavivirus como el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla, y el alfavirus chikungunya, que también son virus (re)emergentes en las Américas. Este mosquito vector es altamente domesticado, viviendo en estrecha asociación con los seres humanos en los hogares urbanos. Sus huevos son resistentes a la desecación, y las larvas se desarrollan rápidamente en ambientes subtropicales y tropicales. El calentamiento climático está facilitando la expansión del rango de *Ae. aegypti*, lo que se suma a la amenaza que este mosquito representa para la salud humana, especialmente a la luz de la dificultad para controlarlo (Powell JR, *et al.*, Tabachnick WJ. 2013).

Transmisión no vectorial

Transmisión infecciosa de orina

Aparte de causar viremia en la sangre del huésped, el virus Zika se ha detectado en la orina humana (Bonaldo *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2019). *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son susceptibles a las infecciones por ZIKV cuando se encuentran reproduciéndose en el medio ambiente acuático contaminado con la orina infectada (Du *et al.*, 2019).

Transmisión sexual

El ARN del ZIKV se ha detectado en el semen de pacientes infectados. Se pudo describir al inicio de la epidemia de Zika, más de 30 casos de transmisión sexual de hombres a mujeres (B Figura 8), un caso de hombre a hombre, y un caso de mujer a hombre (Trew Deckard *et al.*, 2016; Foy *et al.*, 2011), por lo tanto, el virus puede transmitirse entre ambos sexos, sin embargo, la frecuencia de transmisión más alta es de hombre a mujer, ya que este virus puede permanecer en el semen más tiempo que en otros líquidos corporales (Lustig, *et al.*, 2016).

Transfusión de sangre

Se han reportado casos de transmisión de ZIKV por transfusión de sangre en Brasil (Magnus *et al.*, 2018), esto complica la transmisión viral ya que la mayoría de los pacientes infectados con ZIKV son asintomáticos (D Musso, *et al.*, 2014). Las donaciones de sangre asintomáticas pueden transmitir fácilmente ZIKV a los receptores de sangre. Alrededor del 3% de las donaciones de sangre dieron positivo para el virus en el contexto de la epidemia de ZIKV en Brasil. La situación se agrava aún más por el hecho de que el ZIKV puede preservarse en sangre completa de personas infectadas cerca de dos meses. Estos múltiples modos de transmisión de ZIKV hacen que sea muy difícil desarrollar estrategias de control contra el patógeno.

Transmisión vertical e infección de la placenta

El ZIKV se transmite de las madres a sus fetos durante el embarazo (D, Figura 8). El virus ha sido aislado de líquido amniótico, del cerebro fetal, y en el suero de los bebés hasta cuatro días después del nacimiento (Krauer *et al.*, 2017; Besnard *et al.*, 2014; Song y Yun, 2017; Zanolini *et al.*, 2015), demostrando que el ZIKV puede transmitirse de las madres a sus fetos.

A lo largo del embarazo, la placenta es un tejido especializado que actúa como una barrera física e inmunológica contra los patógenos invasores para proteger al feto en desarrollo de los agentes infecciosos. A diferencia de la mayoría de los virus, que no

pueden cruzar la barrera placentaria, el virus Zika (ZIKV), el virus varicela zóster, la rubéola y el citomegalovirus se transmiten de la madre al feto al infectar varios tipos de células placentarias (L. Pereira *et al.*, 2018; Leon-Juarez *et al.*, 2017; Delorme *et al.*, 2014). ZIKV utiliza la ruta vertical para cruzar la placenta y llegar a los tejidos neuronales fetales causando defectos fetales graves (Brasil P, Pereira JP *et al.*, 2016; Smoots *et al.*, 2020). Las vellosidades placentarias derivadas del feto, que están bañadas en sangre materna dentro del espacio intervilloso (**A**. Figura 9), invaden la decidua materna. Las vellosidades placentarias están compuestas por vasos sanguíneos fetales, fibroblastos vellosos y células de Hofbauer en el núcleo veloso, así como citotrofoblastos proliferativos y sincitiotrofoblastos multinucleados, que cubren la superficie de las vellosidades placentarias y el contacto directo con la sangre materna (Figura 9). Los trofoblastos extravillosos se diferencian de los citotrofoblastos e invaden la decidua materna y las arterias espirales maternas. Existe una diafonía sustancial entre las células deciduales maternas y los trofoblastos fetales que son esenciales para un embarazo exitoso. La transmisión vertical mediada por células deciduales del virus ZIKA (**B** Figura 9) representa la ruta potencial de transmisión del virus ZIKV de las células deciduales a las células fetales. Esta presenta una interfaz materno-fetal, en la cual las células deciduales exhiben mayores factores de entrada viral AXL, GAS6 y PROS1 y son más permisivas para dirigir la infección por ZIKV de una manera gestacional dependiente de la edad en comparación con las células extravilosas, trofoblasto o citotrofoblasto. Por lo tanto, el ZIKV infecta y se propaga vía células deciduales a trofoblastos fetales, Hofbauer o células endoteliales. Las células deciduales actúan como reservorios para la transmisión placentaria del ZIKV dependiente del trimestre, lo que explica la mayor susceptibilidad a la infección por ZIKV y las secuelas fetales más graves observadas al principio versus embarazo tardío.

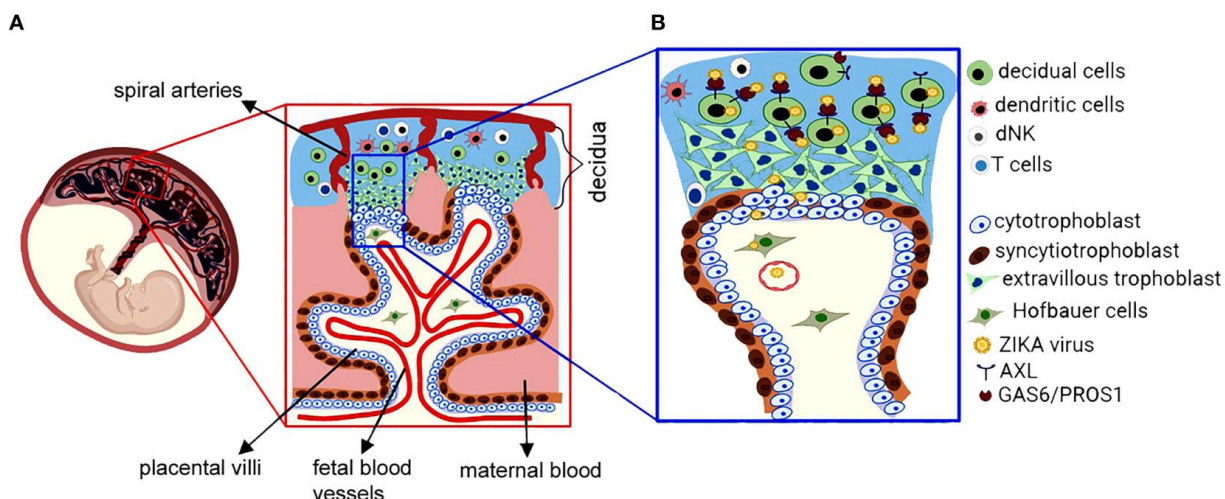


Figura 9. Presentación esquemática de la interfaz materno-fetal y la infección por ZIKV. Tomada de: Ozlem Guzeloglu-Kayisli *et al.*, 2022.

El virus Zika puede cruzar la placenta, que actúa como una barrera física y funcional entre la madre y el feto, protegiendo al bebé de infecciones y toxinas.

La transmisión vertical de ZIKV de la madre infectada al feto causa resultados fetales graves relacionados con síndrome congénito, que incluye microcefalia, convulsiones, hipertonía y otros problemas neurológicos, así como anomalías oculares y esqueléticas etc. (Freitas DA *et al.*, 2020). Durante el embarazo, la infección materna provoca disfunción placentaria que resulta en resultados adversos del embarazo como FGR, aborto espontáneo y/o muerte fetal (Araujo *et al.*, 2018). Durante la epidemia de 2015 en Brasil, el 83% de los recién nacidos expuestos a la infección prenatal por ZIKV fueron pequeños para la edad gestacional (Araujo *et al.*, 2018), mientras que, en los Estados Unidos, se informó que la tasa de pequeños para la edad gestacional fue del 11.2% en mujeres con infección prenatal por ZIKV (Cooper *et al.*, 2019). Otro estudio de Brasil informó que la tasa de resultados adversos generales fue del 46%, que incluyó el 7% de la muerte fetal en embarazos infectados por ZIKV. Recientemente, (Mercado-Reyes *et al.*, 2021) informó que entre las 1180 mujeres embarazadas con síntomas de ZIKV analizadas en Colombia entre 2016-2018, se encontró que los resultados adversos del embarazo fueron del 22.4%, que incluyeron 1.4% de pérdidas de embarazo, 9.7% con problemas pulmonares, 6.9% por debajo del peso promedio al nacer y 4.6% presentaron una edad gestacional más pequeña de lo esperado para

su etapa de desarrollo. Todos estos estudios indicaron que después de la transmisión placentaria, el ZIKV llega al cerebro fetal donde causa graves defectos perjudiciales al interrumpir la proliferación, la migración y la diferenciación, así como inducir la apoptosis, de las células progenitoras neuronales (Charlier C *et al.*, 2017). Estudios recientes demostraron que el ZIKV puede infectar una amplia gama de células en la placenta humana, incluidos citotrofoblastos, células endoteliales, fibroblastos, epiteliales amnióticos y/o células de Hofbauer, así como las células deciduales maternas y causar cambios histopatológicos severos (Guzeloglu-Kayisli O *et al.*, 2020).

Diversos estudios demuestran que el mecanismo dominante de transmisión en el continente americano ha sido la transmisión vía mosquitos, sin embargo, la relevancia e importancia epidemiológica de otros modos de transmisión es menos estudiada como es el caso de la transmisión vertical.

Rol de los microARN (miARN) en la placenta

La placenta se compone principalmente de trofoblastos, células deciduales, células endoteliales y células mesenquimales. Las actividades celulares de estas células, como la proliferación, diferenciación e invasión del trofoblasto, así como la diferenciación de las células mesenquimales, la decidualización y la angiogénesis, son fundamentales para un embarazo saludable. Considerando que la placenta es un órgano fundamental para un embarazo saludable, los estudios sobre los miARN placentarios son importantes para comprender los mecanismos reguladores de los embarazos normales y complejos (J.-F. Mouillet, *et al.*, 2011).

Durante la última década, se ha profundizado en el conocimiento de los miARN y varias investigaciones demuestran su relación con el embarazo. Gracias a estos estudios están surgiendo respuestas sobre los mecanismos moleculares mediante el cual los miARN regulan el embarazo o sus complicaciones asociadas.

Las investigaciones más recientes proponen que los miARN responden al cambio de la condición fisiológica durante el embarazo y facilitan un proceso de embarazo exitoso. Hasta ahora, los estudios de miARN específicos de la placenta en la regulación del embarazo son muy limitados, centrándose únicamente en las

características biológicas básicas. Estudios recientes han demostrado que la expresión de los miARN miembros de C19MC está ampliamente restringida en el sistema reproductivo y la placenta (Y. Liang, *et al.*, 2007, S. Lin, WKC Cheung, S. Chen *et al.*, 2010). Estos hallazgos demuestran que el grupo de miARN del cromosoma 19, también denominado C19MC, es específico de primates, se encuentra impreso en la placenta y es uno del grupo de genes de miARN humano más grande descubierto hasta ahora. Este está regulado por la impronta genómica, sin embargo, solo el alelo heredado paternalmente se expresa en la placenta (Noguer-Dance M, *et al.*, 2010).

El clúster C19MC ha sido identificado en los exosomas (vesículas extracelulares pequeñas) y liberado del trofoblasto primario humano. Este clúster está regulado positivamente en el plasma preecláptico y aumentado en la circulación a temprana edad gestacional. Utilizando una matriz de perfilado de alto rendimiento y PCR cuantitativa, se localizó la expresión abundante de miARN miembros de C19MC en los trofoblastos humanos primarios (RB Donker, JF Mouillet, T. Chu *et al.*, 2012). Además, también se demostró que los miembros del grupo de C19MC se expresan abundantemente en las células estromales mesenquimales derivadas de la placenta (PDMSC), lo que sugiere una posible función reguladora en las células madre/progenitoras (I. Flor, A. Neumann, C. Freter *et al.*, 2012). Se ha demostrado que los miembros de C19MC se expresan temporalmente. Por ejemplo, los miARN específicos de la placenta, incluyendo miR-141 y la familia C19MC, se expresaron diferencialmente en varias etapas del desarrollo para satisfacer las diferentes demandas regulatorias del embarazo (DM Morales-Prieto, W. Chaiwangyen, S. Ospina-Prieto *et al.*, 2012, D. Wang, W. Song y Q. Na, 2012). Recientemente, se reveló parcialmente la implicación y la posible regulación de estos miARN en el embarazo normal y complejo. Se demostró que los miARN específicos de la placenta, miR-141 y miR-519d-3p (un miembro de C19MC), regulan la proliferación, invasión, migración y comunicación intercelular de las células del trofoblasto (DM Morales *et al.*, 2011, J. Ding, F. Huang, G. Wu *et al.*, 2015, S. Ospina-Prieto, W. Chaiwangyen, J. Herrmann *et al.* 2016). Los miARN están involucrados en muchos aspectos del embarazo y sus trastornos. Se demostró que los miARN contribuyen a la tolerancia inmune en el embarazo, la diferenciación de células mesenquimales y la angiogénesis. Se ha

demostrado que varios miARN son los reguladores en la proliferación, migración e invasión de células trofoblásticas.

Se ha demostrado que miR-517a-3p (miR-517a), un miembro altamente expresado del grupo de miARN C19MC, que se transcribe casi exclusivamente en trofoblastos humanos, atenúa la replicación viral mediante la inducción de autofagia en células receptoras no trofoblásticas. Las pequeñas vesículas extracelulares trofoblásticas (exosomas) ingresan a las células a través de vías endosomales y entregan su carga de miARN, incluido el C19MC, a las proteínas del complejo (Krawczynski K *et al.*, 2020). Diversos estudios han demostrado que las células PDMSC, especialmente a término del embarazo, utilizan múltiples mecanismos antivirales para proteger la integridad placentaria. Entre ellos destacan la expresión del clúster de microARN C19MC, el cual se secreta en exosomas y puede inducir un estado antiviral en células vecinas; la producción constitutiva de interferones tipo III, que activa genes estimulados por interferón con propiedades antivirales y, por último, la inducción de autofagia, un proceso celular que contribuye al control de la replicación viral. Además, estas células presentan una baja expresión de receptores de entrada viral y una respuesta innata activa mediada por receptores de reconocimiento. Estos mecanismos en conjunto podrían contribuir a la resistencia de las PDMSC frente al ZIKV. (Bayer A, *et al.*, 2018). Existen varias modalidades de comunicación intercelular que dependen principalmente de la distancia entre las células reproductoras y las receptoras. Estas pueden intercambiar información directamente mediante uniones estrechas o mediante la interacción de moléculas de superficie, mientras que las células más distantes se comunican mediante la liberación de sustancias químicas, ácidos nucleicos libres o vesículas extracelulares que son ricos en miARN placentarios, y que pueden transferirse horizontalmente a las células maternas y regular su comportamiento (Morales-Prieto DM *et al.*, 2020).

Tratamiento

No existe un tratamiento antiviral específico para la infección por ZIKV. Se recomienda el tratamiento sintomático después de excluir afecciones más graves como la malaria, el dengue y las infecciones bacterianas. En la infección aguda, el tratamiento es

sintomático y de apoyo, que consiste en el descanso y el uso de acetaminofén para aliviar la fiebre (<4g/día). El uso de ibuprofeno, naproxeno u otros agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) para aliviar el componente artrítico de la enfermedad se puede usar cuando se descarta la infección por dengue. Se debe aconsejar a los pacientes que beban muchos líquidos para reponer el líquido perdido por sudoración, vómitos y otras pérdidas insensibles (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2016).

Existen pautas específicas para los proveedores de atención médica que atienden a bebés y niños con posible infección por el virus del Zika en el sitio web oficial de los CDC. Estas guías recomiendan la evaluación clínica y las pruebas de laboratorio para bebés con posible infección congénita por ZIKV, con o sin microcefalia o calcificaciones intracraneales (K.E. Fleming-Dutra, J. M. Nelson, M. Fischer, *et al.*, 2016). Las mujeres que han tenido la enfermedad del virus del Zika o la exposición sin enfermedad clínica deben esperar al menos 8 semanas después del inicio de los síntomas para intentar la concepción. Los hombres con enfermedad por ZIKV deben esperar al menos 6 meses después del inicio de los síntomas, o 8 semanas después de la exposición al virus sin enfermedad clínica, para intentar la concepción. Estas medidas permiten disminuir el riesgo de transmisión sexual. Estas pautas del CDC también proporcionan recomendaciones actualizadas para las pruebas de mujeres embarazadas con posible exposición al ZIKV (E.E. Petersen, K.N. Polen, D. Meaney-Delman, *et al.*, 2016).

Actualmente se están realizando ensayos clínicos de cinco tipos de vacunas contra el ZIKV; vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas, vacunas de ácidos nucleicos, vacunas virales vectorizadas y vacunas de subunidades recombinantes. Desarrollar vacunas ZIKV seguras y eficaces sigue siendo un desafío para investigadores y científicos (Peng Z-Y, *et al.*, 2024).

Con todo lo anterior, incluir el antecedente que justifica la importancia de estudiar la actividad antiviral a ZIKV, específicamente en células madre mesenquimales de la placenta.

OBJETIVOS

Objetivo General

Describir si los sobrenadantes de PDMSC modifica la permisibilidad a la infección por ZIKV en células susceptibles.

Objetivos específicos

1. Observar si el sobrenadante secretado por las PDMSCs transfiere a otros tipos celulares la resistencia al efecto citopático inducido por la infección por el virus del Zika.
2. Evaluar si el sobrenadante secretado por las PDMSCs transfiere a otros tipos celulares resistencia antiviral que disminuya la replicación del virus del Zika.
3. Determinar si las PDMSCs expresan el grupo de miRNA de placenta C19MC previamente asociado a actividad antiviral

HIPÓTESIS

El sobrenadante de las PDMSC tiene influencia en el estado antiviral contra el virus del Zika (ZIKV), transfiriendo resistencia a células susceptibles VERO y HEK-293T.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Tipo de investigación:

Experimental.

Diseño del estudio

Este estudio fue de tipo experimental in vitro, en donde se utilizó cultivos de líneas celulares immortalizadas (HEK 293T, VERO), células madre mesenquimales derivadas de placenta (PDMSC) y un aislado viral de Zika. El estudio forma parte de un proyecto de investigación "Efecto del virus Zika sobre el grupo de miARN C19MC específico de placenta" aprobado por la SENACYT en contrato por mérito con el ICGES, dentro de la Convocatoria Pública de Fomento a la Investigación y Desarrollo (FID) 2018 (FID18-043). El protocolo del proyecto se encuentra registrado en RESEGIS y pasó por el Comité Nacional de Bioética de la Investigación (CNBI) (protocolo EC-CNBI-2019-06-41), ya que se trabaja con PDMSC que son células madre primarias, cumpliendo con todos los permisos requeridos para su ejecución. El estudio experimental que se realizó en la investigación de tesis para optar por el título de licenciatura en biología con orientación en microbiología y parasitología, no se requirió de participantes humanos para la toma de datos personales, solo se utilizaron las PDMSC.

Tipo de muestra

Se utilizó una cepa de ZIKV aislada durante la vigilancia y diagnóstico, como parte de la labor del DIVB del ICGES. ZIKV aislado GMI-263569 (linaje asiático, sub-linaje de las Américas, que circuló en Panamá) (Araúz D, 2016). El virus se encuentra conservado a -80°C en el DIVB del ICGES. Según el reglamento de las medidas de bioseguridad este virus debe ser utilizado dentro del laboratorio BSL-2 del ICGES.

Las líneas celulares VERO y HEK-293T fueron adquiridas a través del repositorio de las Américas ATCC por el DIVB del ICGES:

- VERO (ATCC® CCL-81™), línea celular immortalizada proveniente de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*.

- HEK-293T (ATCC® CRL-1573™), línea celular inmortalizada que presenta morfología epitelial y que se aisló del riñón de un embrión humano, *Homo sapiens*.

Las células madre mesenquimales derivadas de placenta (PDMSC), que son células primarias, provienen del biorepositorio de PDMSCs aisladas de placenta de madres sanas control. Se utilizarán células madre mesenquimales derivadas de la placenta de mujeres sanas, cuyas muestras se encuentren almacenadas en el Laboratorio de Criopreservación de Células Madre del ICGES y hayan sido obtenidas bajo el consentimiento informado ampliado aprobado por el CNBI para Donación de Placentas para Investigación de Células Madre Mesenquimales. El proceso para reclutamiento de las participantes y recolección de placenta se realizó bajo los procedimientos previamente aprobado en los protocolos de investigación EC-CNBI-2017-29 y EC-CNBI-2017-30.

Medidas de bioseguridad

Para efecto de este proyecto de investigación, se tomó en cuenta todas las medidas de bioseguridad requeridas, ya que el virus del Zika está clasificado como nivel de riesgo biológico 2, por lo que se siguió todos los lineamientos de bioseguridad de un laboratorio de nivel 2 (BSL-2), al igual que las líneas celulares VERO y HEK-293T previo a la infección con ZIKV, fueron trabajadas en un laboratorio de cultivo especial con área limpia. Antes del desarrollo de los experimentos de este proyecto de investigación se realizaron capacitaciones, cursos teóricos y prácticos correspondientes (BPCL, Bioseguridad) para el empleo y uso adecuado de todos los equipos y espacio dentro de los laboratorios.

Materiales

Para esta investigación se utilizaron los siguientes reactivos:

- Kit de Aislamiento de Ácido Nucleico MagMAX™ Viral/Patógeno II (MVP II).

El Kit de Aislamiento de Ácido Nucleico MagMAX Viral/Patógeno II es un kit de purificación de ácido nucleico basado en tecnología de perlas magnéticas. Este kit está

destinado al aislamiento y purificación de ácidos nucleicos virales y es adecuado para su uso en la detección molecular por qPCR.

- Invitrogen™ SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System.

El Sistema de Síntesis de Primera Hebra SuperScript IV para RT-PCR, disponible con o sin ezDNasa, está optimizado para la síntesis de ADNc de primera hebra a partir de poli(A)+ purificado o ARN total. El sistema incluye SuperScript IV Reverse Transcriptase (RT), un mutante MMLV patentado que produce síntesis de ADNc robusta y confiable en reacciones de RT. Este sistema está diseñado para proporcionar una síntesis de ADNc confiable, consistente y rápida en presencia de inhibidores que se encuentran en una amplia variedad de muestras.

- SYBR® Green supermezclas para PCR en tiempo real

SYBR Green de Bio-Rad® es una formulación probada para una amplia variedad de ensayos que ofrecen resultados de PCR en tiempo real confiables y consistentes. Los sistemas de detección por PCR en tiempo real Bio-Rad cuentan con una programación simple para realizar automáticamente un análisis de la curva de fusión convenientemente después de la ejecución principal de amplificación y cuantificación. Este, cuenta con enzimas avanzadas y formulaciones de tampón para garantizar una velocidad, sensibilidad y especificidad para los sistemas de detección de PCR en tiempo real.

- Kit ROCHE LightCycler® 480 SYBR Green para-PCR en tiempo real

Es un sistema de reactivos utilizado para la PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR), que es una técnica de biología molecular que combina la transcripción inversa de ARN en ADN complementario (cADN) con amplificación y detección mediante qPCR (PCR en tiempo real) esto permite la cuantificación de moléculas de ARN de una muestra. Contiene ADN polimerasa FastStart Taq y colorante SYBR Green I específico de doble cadena de ADN para la detección y caracterización de productos de PCR, es adecuada para aplicaciones de alto rendimiento en placas de 96 o 384 pocillos en el LightCycler®480.

Métodos

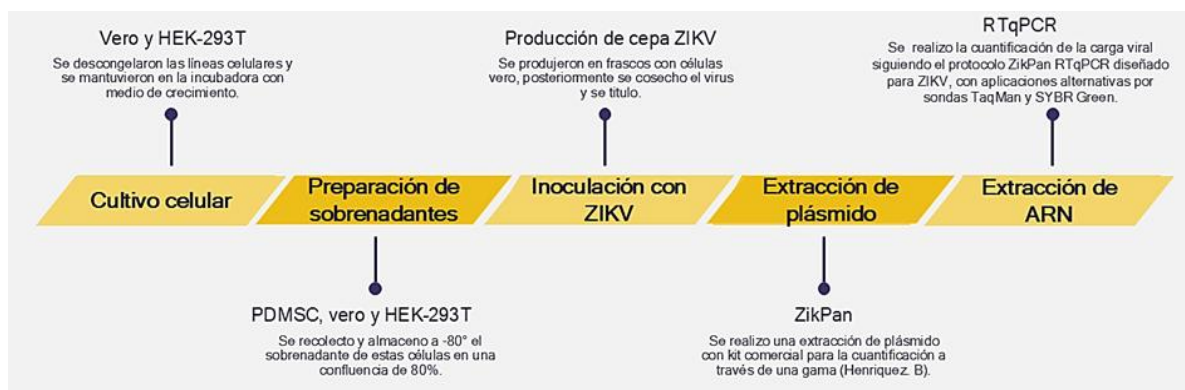


Figura 10. Esquema general de metodología experimental

Cultivo de líneas celulares VERO y HEK-293T

Se descongelaron las líneas celulares VERO y HEK-293T, que se encontraban conservadas en nitrógeno líquido en el DIVB del ICGES. Se sacó un vial de cada línea, que contiene alrededor de 10 millones de células congeladas en 90% de suero fetal bovino (SFB) y 10% del crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO), y se colocó en baño maría a 37°C hasta descongelarse. Una vez descongeladas las células, se transfirió la suspensión celular lentamente a un tubo cónico de 15ml con 10ml de medio de crecimiento DMEM (Dulbecco's Minimum essential medium con 10% de SFB, 100U/ml de penicilina-estreptomicina) para ambas líneas de células (Figura 12). Se centrifugaron los tubos con la suspensión celular a 1500 RPM por 3 minutos a 4°C, con el fin de eliminar restos de DMSO. Posteriormente se resuspendió el botón de células en medio de crecimiento para luego ser sembradas en un frasco de cultivo de 25 cm², y se incubaron a 37°C con 5% CO₂. A las 24 horas el frasco de 25cm² ya se encontraba al 90-100% de confluencia por lo que se procedió a despegar las células con tripsina-EDTA 0.05%, una vez despegadas, las células se ponen en un nuevo medio DMEM de crecimiento para pasarlas a un frasco de 75cm² e incubarlas a 37°C con 5% de CO₂ para su mantenimiento y preparación de platos para el experimento. Fue necesario observar diariamente el crecimiento de las células, para verificar su morfología y confluencia y determinar en qué momento hacerles pasaje (80-100% de confluencia) o cambiar el medio (más de 3 días en el mismo medio, pero con menos

del 70% de confluencia), de esta manera las células se mantuvieron en cultivo hasta un máximo de 22 pasajes durante la realización de los experimentos.

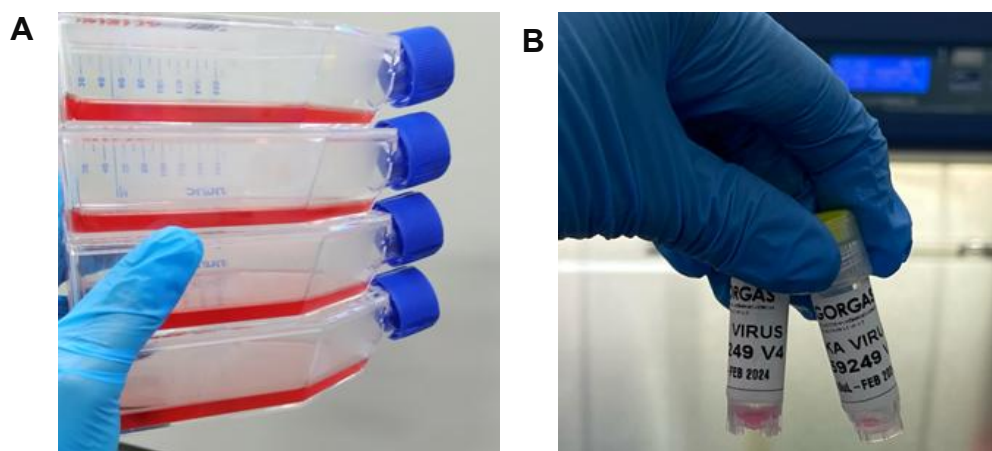


Figura 11. Cultivo celular de PDMSC y Cepa de ZIKV

(A) Frascos de cultivo de 75cm² con células VERO o HEK-293T en crecimiento para la colecta de sobrenadnates. (B) Cepa de ZIKV aislado GMI-263569 (linaje asiático, sub-linaje de las Américas, que circuló en Panamá) (Araúz D, 2016).

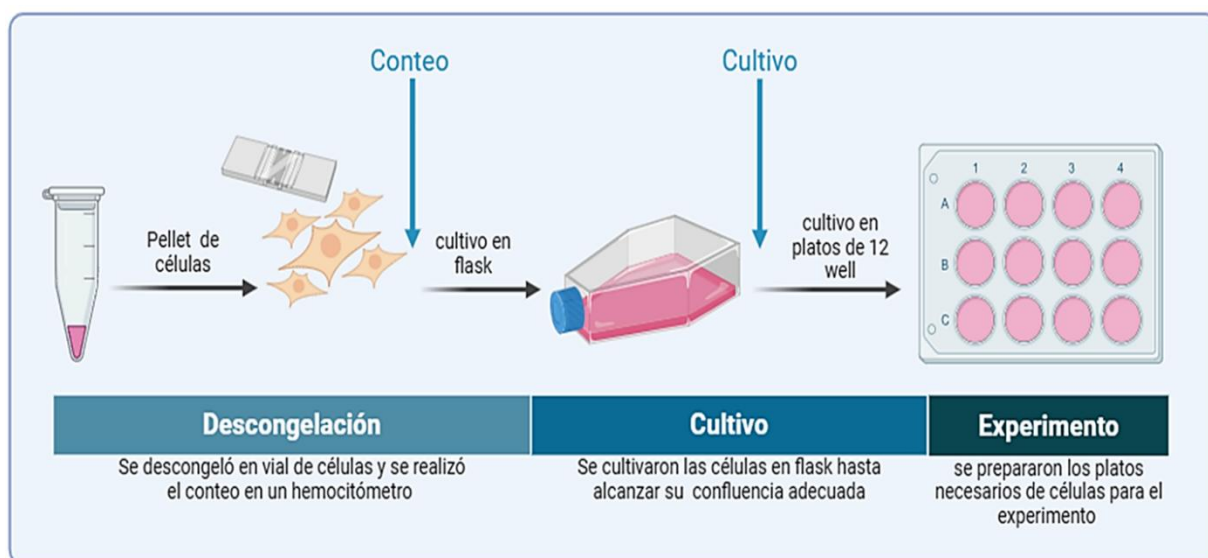


Figura 12. Cultivo celular primario

Previamente descongelados los viales de células a utilizar, se realizó un conteo con hemocitómetro para saber la cantidad de células a cultivar en los platos de 12 pocillos.

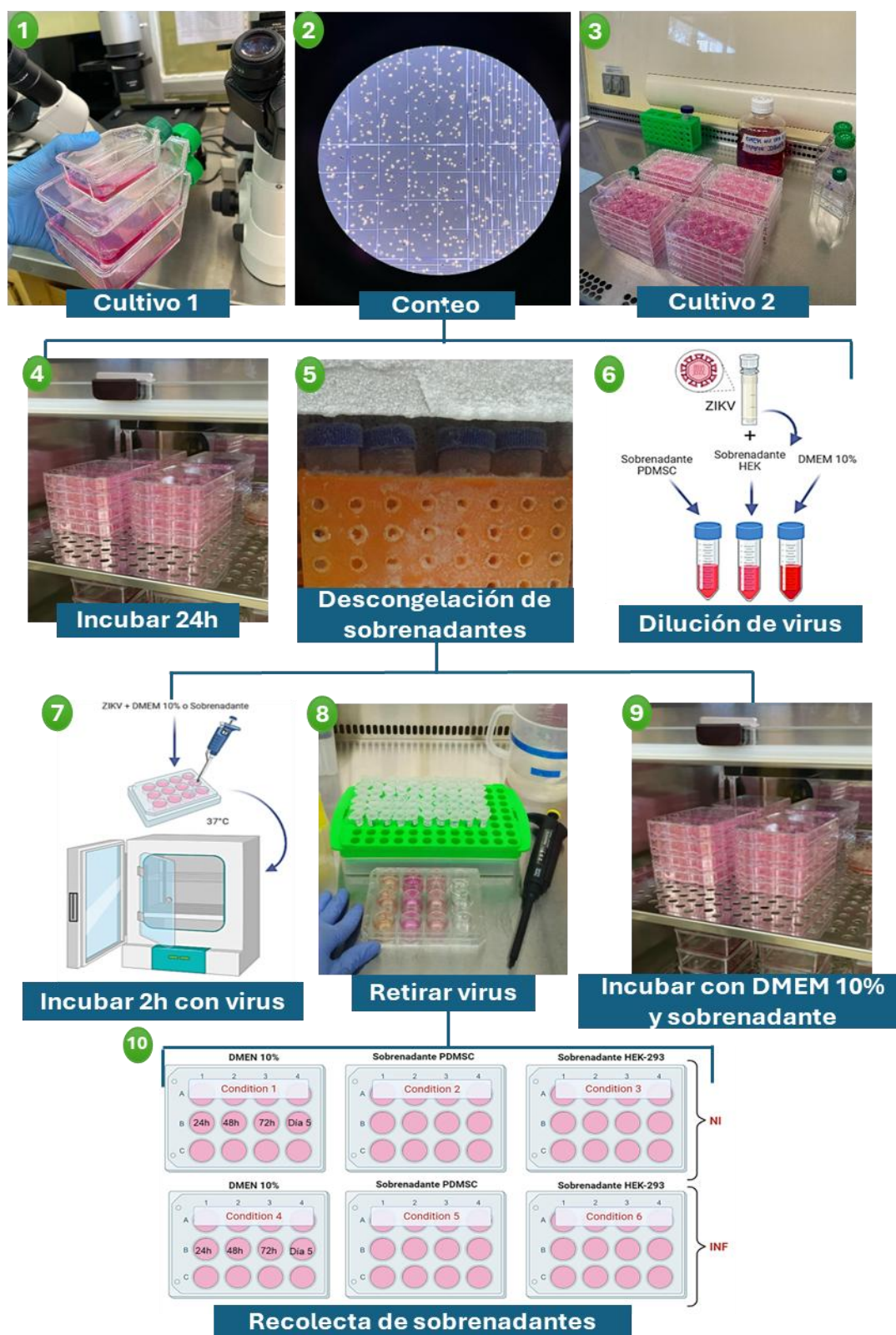


Figura 13. Esquema de metodología. Diseño esquemático del diseño experimental utilizado en el estudio, incluyendo los principales pasos y materiales empleados.

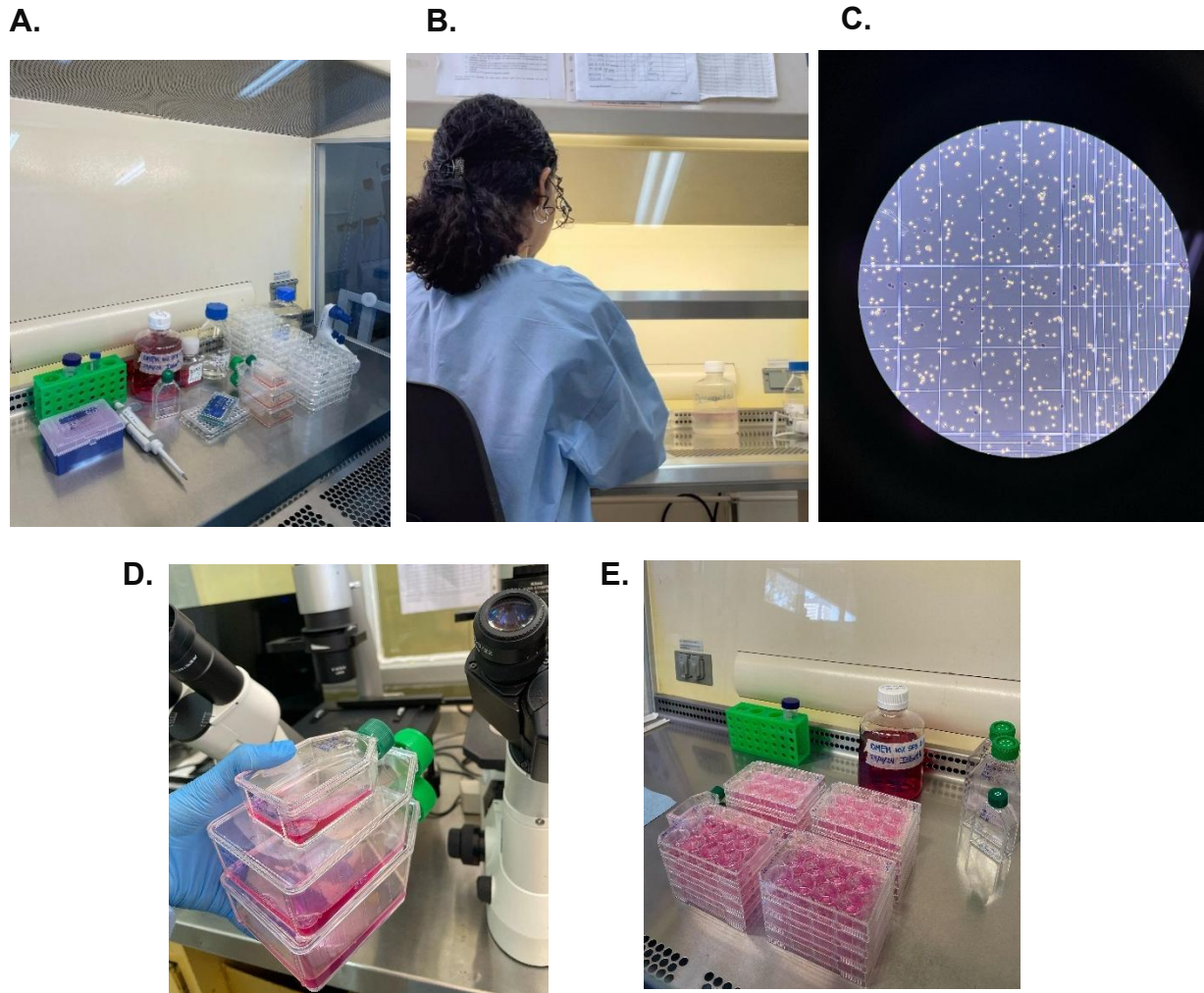


Figura.14. Esquema de cultivo celular. (A) Materiales utilizados; (B) colocación de tripsina para despegar las células de la monocapa; (C) conteo de células en la cámara de Neubauer para saber con exactitud cuántos millones sembrar; (D) Frascos con las células VERO y Hek-293T; (E) platos de 12 pocillos con células utilizados para el experimento.

Preparación de sobrenadantes de PDMSC y HEK 293T

Las células madre mesenquimales (PDMSC) fueron aisladas de placenta a término de donantes voluntarias como fue descrito previamente (Liu CM et al, 2008, DOI:

<https://doi.org/10.37980/im.journal.rmdp.2020833>) por el equipo de investigación de células madre dirigido por la Dra. Mairim Solis, co-asesora de este trabajo de tesis,

Departamento de Investigación Salud Sexual y Reproductiva, ICGES. Las células crecen en medio DMEM-low glucose con 10% de SFB, 100U/ml de penicilina-estreptomicina y gentamicina en frascos de 75 cm² a 37°C Y 5% CO₂. Una vez estén en confluencia (entre un 80-100%), se realiza un cambio de medio a RPMI con 10% de SFB, 100U/ml de penicilina-estreptomicina y se colecta el medio al día 5 de cultivo. El sobrenadante de las células confluentes se congela a -80°C para uso ulterior en los experimentos.

Del mismo modo, se preparó el sobrenadante proveniente del cultivo la línea celular HEK 293T como control experimental, con la diferencia que el medio de crecimiento de estas células es el DMEM de crecimiento y que, debido a su rápido crecimiento, llegan a confluencia al día 3 de cultivo

Producción del virus del Zika, en línea celular VERO

Inoculación con virus

Para la producción de virus del Zika se emplearon dos frascos de 75cm² con células VERO con un pasaje final no mayor de 22. Se trabajó con una confluencia celular de 80 - 85% con Medio Mínimo Esencial (MEM) al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), ya que los flavivirus prefieren estas células para su producción y un frasco de 25 cm² con células VERO que no se infectan, que será utilizado como control negativo. Se descongeló una alícuota del ZIKV, aislado GMI263569 (linaje asiático, sub-linaje de las Américas, que circuló en Panamá) (Araúz D, *et al.*, 2016) y se descartó el medio al 10% de las células y se resuspendió dos tubos de 500 µl del ZIKV en 1 mL de MEM al 2% de SFB, luego se inoculó la monocapa de células de cada frasco agregando 1 mL del virus ya diluido. Posteriormente se dejó absorber por 1 hora a 37°C en la incubadora, cada 15 minutos se le realizaron movimientos circulares (agitación suave) a cada uno de los frascos para que la infección sea lo más diseminada posible. Luego de 1 hora de absorción, se le agregó a cada frasco 15 ml de medio MEM sin SFB y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ hasta 5 días.

Cosecha de virus

Cuando observamos un ECP (efecto citopático) de tres cruces (+++) que corresponden aproximadamente a 75% de las células infectadas y con efecto citopático visible inducido por el virus nos indicó que era el momento adecuado para proceder a realizar la cosecha del virus que se encuentra en el sobrenadante celular. Cabe recalcar que para este procedimiento fue necesario llevar a cabo observaciones diarias en el microscopio óptico invertido para evaluar el ECP del virus en las células y se cosechó cuando el ECP producido destruyó $\frac{3}{4}$ del monocapa celular. Dentro de una Cámara de Flujo Laminar, con ayuda de un raspador se removieron las células adheridas a la superficie del frasco, y con la ayuda de una pipeta serológica de 5 mL, se retiró el contenido del sobrenadante celular con las células despegadas y se colocó en dos tubos cónico de 50 mL. Se procedió a realizar una centrifugación de 2000 RPM durante 10 min a 4°C. Los tubos retirados se colocaron en una gradilla dentro de una cubeta con hielo, ya que es indispensable mantener el virus producido esté en frío para no bajar su carga viral y afectar su título infeccioso. Con cuidado de no transferir el pellet de células, se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo cónico de 50 mL, se agitó en un vórtex para homogeneizar, y se dividió en alícuotas en crioviales de 1.5 mL con volúmenes de 30µL, 50µL 100µL y 1mL. Por último, se guardaron los crioviales en una caja Stock de virus que se conservó a -80°C. Esta cosecha de virus se realizó siguiendo los protocolos internos del DIVB del ICGES.

Titulación del virus

Para la titulación del virus Zika, se preparó, 24 horas antes de la inoculación, 1 plato de 12 pocillos de células VERO para que tenga un 80 - 85% de confluencia al momento de la infección. Realizamos las diluciones seriadas del virus Zika cepa GMI263569 (iniciando con 1:10) desde 10^{-1} hasta 10^{-8} utilizando DMEM sin SFB, manteniendo en hielo continuamente. Luego se retiró el medio de las células para transferir 500µL de inóculo viral correspondiente a cada dilución al pocillo de cultivo celular, cada dilución es trabajada por duplicado, mezclando siempre con vortex antes de servirla. Las 3 primeras diluciones (10^1 hasta 10^3) no es necesario inocularlas para el ZIKV, porque

generalmente tiene un título superior a 10^4 , y se podrá iniciar en la dilución 10^4 . Incubar la mezcla de células/dilución de virus a 37°C , 5 % CO_2 por 1 hora mezclando con movimientos circulares cada 15 minutos. Pasada la hora, se cubrió cada pocillo con 3.0 ml de DMEM con 1% SFB y con agarosa al 0,6 %, y se incubó a 37°C hasta que aparezcan las placas visibles (fue necesario revisar diariamente al microscopio y directamente, aunque en el caso de ZIKV, generalmente toma 5 días). Fijamos los platos con Formaldehído al 10 % en cámara de gases durante 20 minutos. Posterior a este tiempo retiramos el formaldehído con la agarosa, desechando en sus envases correspondientes. Teñimos los platos con violeta cristal al 0,5 % (en 20 % de etanol o 37 % de metanol) por 3 minutos, cubriendo toda la superficie del plato. Transcurridos los 3 minutos lavamos cuidadosamente en chorro de agua y secamos colocando los platos boca abajo en papel toalla.

Finalmente, se procede a realizar el conteo de Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL) y calcular el título viral, se determinaron las UFP/mL, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \frac{(\text{Número de placas contadas}) (\text{Factor de Dilución})}{\text{Volumen inóculo (mL)}}$$

Efecto Citopático de ZIKV en células VERO y HEK-293T pretratados con sobrenadantes o no

Para la parte experimental se utilizó los sobrenadantes de células PDMSC y HEK-293T confluentes conservados a -80°C . Se preparan los platos de cultivo de 12 pocillos con células VERO y HEK-293T, como modelo de a ZIKV, células susceptibles, con una dilución celular de 1:8 para obtener una confluencia 80 - 85% a las 24h. Se contaron la cantidad exacta de células por pocillo con la cámara de Neubauer, para calcular el volumen de virus a utilizar para realizar los experimentos a la multiplicidad de infección (MOI) de 2. La MOI corresponde a la cantidad de unidades virales infecciosas por célula, siendo la MOI de 2, dos partículas infecciosas por cada célula.

La MOI se calculó con la siguiente formula:

$$\text{MOI} = \frac{(\text{Título viral (PFU/mL)})(\text{Volumen del inóculo (mL)})}{\text{Total de células}}$$

A las 24 horas del cultivo de células VERO y HEK 293T, miramos la confluencia en el microscopio antes de infectar con ZIKV. Retiramos el medio de crecimiento y según correspondía, a cada pocillo se le agregó 500µL de DMEM 10% y 500 µL de sobrenadante PDMSC o de sobrenadante de HEK 293T o medio solo. Luego de agregar el medio de cultivo y sobrenadante, se incubaron a 37°C por 2h y se les hizo movimientos circulares a los platos cada 15 minutos. Después de este pretratamiento de 2h con sobrenadante de células PDMSC o de HEK 293T, quitamos el mismo y lavamos las células cuidadosamente con 500µL de PBS para realizar la infección. Se realizó la inoculación de las células con 125µL/pocillo de virus diluido para tener la cantidad calculada de virus para la MOI de 2; en este caso particular, para mantener las condiciones de pretratamiento, el virus fue diluido en cada uno de los tubos para cada tratamiento (Virus + DMEM 10% como control negativo (CN), Virus + sobrenadante PDMSC, Virus + sobrenadante de célula susceptible HEK-293T como otro CN de sobrenadante de células humanas no provenientes de la placenta). Incubamos a 37°C por 1h, realizamos movimientos circulares cada 15 minutos. Después de la hora de absorción, se descartó el virus diluido y según correspondía a cada condición, se le agregó 2 mL de DMEM 10% solo o 1 mL de DMEM 10% y 1 mL de sobrenadante de PDMSC o 1 mL de DMEM 10% y 1 mL de sobrenadante de HEK-293T, para dejar incubando a 37°C. Observamos el efecto citopático (CPE) por microscopia visible a través del tiempo cada 24 horas, hasta 72h para las células VERO y hasta día 5 para las células HEK-293T. Luego de observar el efecto del virus en las células, recogimos el sobrenadante de cada condición en los diferentes tiempos, en alícuotas de 200µL, para luego hacer el análisis mediante técnica molecular y titulación viral. Al final del tiempo de incubación pos-infección (72h para VERO y 5 días para HEK-293T, respectivamente), lavamos con PBS la monocapa de células y agregamos 200µL de PBS, raspamos y recogimos las células despegadas, que se centrifugaron para descartar el resuspendido y guardar el botón de células a -80°C junto con los viales de los sobrenadantes.

Se analizó la diferencia de inducción de efecto citopático (datos cualitativos) y la diferencia de carga viral (datos cuantitativos) para determinar si el pretratamiento con sobrenadante modula o no la susceptibilidad a la infección por ZIKV. Para estos datos cuantitativos, se realizaron análisis estadísticos con la prueba de Mann-Whitney entre cada condición, para detectar la replicación de ZIKV y su modulación específicamente por el sobrenadante de PDMSC en las células VERO y HEK-293T infectadas y células JAR WT y JAR KO.

Metodología molecular

Extracción de plásmido

Para la cuantificación a través de una gama de plásmido Zika, se utiliza un plásmido que contiene el segmento del gen de ZIKV reconocido por los cebadores del método de detección molecular del virus por RT-qPCR. Para esto, fue necesario realizar la extracción del plásmido ZikPan (Hernandez B et al, no publicado) mediante un kit comercial (Plasmid DNA purification, NucleoBond® Xtra, Macherey-Nagel GmbH et al., co. KG) diseñado específicamente para extraer ADN plasmídico directamente de cultivo bacteriano puro.

Se realizó el siguiente procedimiento para la purificación de plásmido de alta copia:

Se preparó un cultivo de medio LB (medio de cultivo bacteriano que se utiliza para crecer bacterias como la *Escherichia coli*) con 25g de medio LB diluido en 1L de agua destilada, que se autoclavó. por 3h. Una vez enfriado, se le añadió ampicilina al medio para garantizar la propagación de sólo las bacterias *E. coli* que contienen el plásmido ZIKPan que contiene el gen de resistencia a la ampicilina. Se inoculó 500 ml de LB con ampicilina con bacterias transformadas previamente (stock de bacterias congeladas con glicerol y conservadas a -80°C), y se colocó a incubar el cultivo nuevamente agitando a 37 °C y 74 rpm durante 18h. Luego se cosecha las células bacterianas del maxi cultivo, realizando centrifugaciones de 3200 RCF por 15 min a 4°C en tubos de 50mL para así obtener el volumen final de cultivo recomendado para

realizar la extracción de plásmido ZikPan a partir de las bacterias. Se resuspendió el pellet de bacterias en 12 mL de Buffer RES (resuspensión) + RNasa A mediante pipeteo de las células hacia arriba y hacia abajo. Para una lisis celular eficiente, es importante que no quedaran grumos en la suspensión. El siguiente paso es la lisis celular, agregando a la suspensión 12 mL de Buffer LYS y mezclando suavemente invirtiendo el tubo 5 veces, antes de incubar a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 5 minutos. Para extraer el ADN plasmídico se utilizan columnas NucleoBond® Xtra, que se equilibran antes de poner el producto de lisis, agregando 25 mL de Equilibration Buffer EQU, asegurándonos de humedecer todo el filtro, hasta permitir que la columna se vacíe por flujo de gravedad. Para la neutralización de la lisis, agregamos 12 mL de amortiguador de neutralización (Buffer NEU) a la suspensión e inmediatamente mezclamos el lisado suavemente, sin hacer remolino, invirtiendo el tubo hasta que las muestras azules se vuelvan completamente incoloras. Una vez la suspensión homogénea, se aplica el lisado al filtro de columna equilibrado, volviendo a llenar el filtro si es necesario, hasta que la columna se vacíe por flujo de gravedad. Se realizan varios lavados del filtro de columna, el primero con 15 mL de Buffer EQU, y el segundo lavado con 15 mL de Buffer WASH directamente de la columna, quitando el filtro para evitar la baja pureza. La elución de ADN plasmídico de la columna se hizo con 15 mL de Buffer ELU y se agregó al eluido 10.5 mL de Isopropanol puro, mezclando por vortex por 2 min. Posteriormente se hizo la centrifugación de 3200 RCF por 15 min a 4°C para la concentración de plásmidos y la desalinización. Se realizó un lavado y secado añadiendo 70% de etanol a temperatura ambiente al pellet de ADN, y se centrifugó a 3200 RCF por 15 min a 4°C. Como último paso se hace la reconstitución disolviendo el gránulo de ADN en un volumen apropiado de amortiguador de agua ultrapura.

Se midió la pureza del ADN plasmídico en el espectrofotómetro de micro volumen (NanoDrop). El plásmido es conservado a -80C y será utilizado luego para hacer una gama de diluciones de 10^7 - 10^1 copias/ml.

Extracción de ARN viral

Se realizó la extracción automatizada del ARN viral del sobrenadante de las células infectadas con ZIKV, utilizando el equipo King Fisher Flex y los reactivos de extracción MagMax de ThermoFisher, cuyo principio consiste en extraer el ARN/ADN viral de forma eficiente con el sistema de purificación por partículas con perlas magnéticas. Para la extracción de ARN se realizó el siguiente procedimiento: se descongelaron las muestras de sobrenadante recolectadas del experimento. Se preparó un plato de 96 pocillos con 280 μL de solución Binding con perlas magnéticas por pocillo en donde cuidadosamente se añadió 200 μL de cada muestra a cada pocillo. Este sistema automatizado permite que la muestra adherida a las perlas magnéticas sea transferida a otros platos, uno con 500 μL del W1 para un primer lavado, el segundo plato con 1000 μL de W2 (Etanol 80%), y el tercer plato correspondió a la elución, en donde se agregó 40 μL de H_2O ultrapura.

Este protocolo se siguió tomando en cuenta las indicaciones del fabricante del Kit de Aislamiento de Ácido Nucleico MagMAX™.

RT-qPCR en tiempo real

A partir del ARN extraído de los sobrenadantes, se realizó la cuantificación del ARN viral por RT-qPCR en tiempo real para analizar la replicación del virus de Zika en líneas celulares VERO y HEK-293T. Esto permite calcular la carga viral (copias de genoma viral ARN / mL) a través del tiempo.

Para los ensayos se utilizó el kit de síntesis de cDNA SuperScrip®IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction, (Invitrogen™, Cat. No. 18091050), que utiliza una química de transcripción inversa (RT) universal para preparar la plantilla de cADN para la detección y cuantificación de ARN viral. Los cebadores RT universales reconocen las secuencias universales presentes en los extremos extendidos 5' y 3'. Todos los ARN maduros de la muestra fueron transcritos de forma inversa a cADN. Se formaron reacciones de 20 μL de mezcla de reacción que contenían lo siguiente: 1 μL de 50 μM random hexamers, 1 μL de 10mM dNTP mix (10 mM each), 13 μL de agua libre de

nucleasa y 5 µL de la muestra de ARN. Este primer mix se incubó a 65°C por 5 min, a 4°C por 1 min.

Seguidamente se preparó un segundo mix de reacción para la RT, el cual contenía 4 µL de 5x SSIV Buffer, 1 µL de 100mM DTT, 1 µL de RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor y 1 µL de SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/ µL). Se mezcló este mix y se agregó 7 µL por pocillo a la reacción del primer mix. Se incubó a 23°C por 10 min, 50°C por 10 min para realizar la retrotranscripción, seguidamente se inactivó la reacción con una incubación de 80°C por 10 min. El cADN se utiliza directamente para la detección específica de los genes de interés o se guarda a -80°C.

Los primers ZIKPan permiten amplificar el cADN del ARN viral y pueden ser utilizados en PCR en tiempo real por SYBR, que permite detectar el material amplificado por un intercalante fluorescente verde, o por otros kits de qPCR directamente con sondas ZIKPan asociadas a fluorocromos.

Tabla 1. **Secuencias de primers y sondas utilizadas en Real-Time RT-PCR Assay**

Primer	Secuencia
ZikPan cebador sentido	5'-GATACCTGCAGCCCTATGGA-3'
ZikPan cebador anti- sentido	5'-TTAAGACGGACTATGTTCCA-3'
ZikPanPro	5'-/56-FAM/TTGGTGCA+A+A+GCTATGGGT-/BHQ_1/-3'

Los cebadores y el diseño de la sonda ZikPan (Tabla 1) se basaron en una secuencia altamente conservada del gen de la ARN polimerasa del ZIKV (NSP5) mediante la descarga y el análisis de todos los genomas completos del ZIKV del brote estadounidense disponibles en GenBank (creados por el equipo de investigación del ICGES, Henriquez. B. Artículo científico en proceso de publicación).

Para los ensayos con SYBR Green se utilizó el kit Power SYBR® Green PCR Máster Mix (Applied Biosystems, Cat. No. 4367659). Se realizaron reacciones de un volumen

total de 20 µL de mezcla que contenía lo siguiente: 10 µL de Power SYBR Green PCR Máster Mix 2x, 0.1 µL de QN ROX, 1µL de cebador sentido ZikPan (3 µM), 1 µL de cebador anti-sentido ZikPan (3 µM), 2 µL de cADN y 5.9 µL de agua grado molecular para completar la reacción (Tabla 3). El programa de qPCR ejecutado fue el siguiente: Desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, luego 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 56°C y 1 minuto a 72°C; curva de disociación con el siguiente programa: 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C con incremento de cada 1°C hasta la desnaturalización final de 15 segundos a 95°C. Para corroborar la detección de un único producto se verificó la curva de disociación generada por el equipo.

Tabla 2. **Mezcla de reacción utilizada para la detección de ZIKV por SYBR Green.** Utilizando el protocolo con sondas y los plásmidos ZikPan, respectivamente, desarrollados por (Henriquez. B) (artículo en revisión).

Componentes	Volumen de reacción
Powe SYBR Green Máster rmix (2x)	10 µl
QN ROX	0.1 µl
Primer cebador sentido ZikPan	1 µl
Primer cebador anti- sentido ZikPan	1 µl
Agua libre de nucleasas	5.9 µl
cADN (muestra)	2 µl
Total de la reacción	20 µl

Tabla 3. **Ciclos de amplificación para la detección de ZIKV.** Utilizando el protocolo ZikPan, respectivamente, (Henriquez. B) (artículo en publicación).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 min	1
95°C	1 min	40
56°C	30 seg	
72°C	1 min	
95°C	15 seg	
60°C	1 min	
95°C	15 seg	

Este protocolo permitió determinar la carga viral de ZIKV a través del tiempo, ya que se utilizó la gama de plásmido ZikPan con cantidades predeterminadas en la reacción de SYBR.

Síntesis de cDNA

Muestras de ARN de ZIKV en células JAR WT y JAR KO

Para la síntesis de cADN se utilizó el kit LunaScript™ RT SuperMix Kit (L E3010L). Mezclamos los componentes brevemente realizando vortex y luego preparamos la reacción de síntesis de cADN realizando un mix de 4 µl LunaScript RT Super Mix (5X), 500 µg/µl de la muestra de RNA y por último le añadimos 16 µl de agua libre de nucleasa o ultrapura que en total nos dio 20 µl por reacción, seguidamente se realizó las incubaciones con los tiempos de ciclado (tabla 3).

Tabla 4. Ciclos de incubación para la síntesis de cADN para muestras de ARN ZIKA en células JAR WT y JAR KO.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
25°C	2 minutos	1
55°C	10 minutos	1
95°C	1 minuto	1

Esta síntesis de cADN se realizó en un experimento con reproducibilidad biológica, donde utilizamos muestras de ARN de las células JAR WT y JAR KO con una MOI de 10 en diferentes tiempos, 6, 16 y 48 horas para luego analizar el ARN transcriptómico y cuantificar la actividad de los genes o también llamada expresión génica. Se calculó 500 ng/μl de cada muestra para hacer cADN, mediante la fórmula ($C1V1=C2V2$) y la cantidad de agua para completar 16 μl de cada reacción o muestra.

RT-qPCR - kit ROCHE Lightcycler 480 SYBR green

Después de la RT con kit Luna (NEB) a partir de 500 ng de ARN, los primers (100 μM) se diluyen a 1/10 en H₂O ultrapura y se conservan a -20°C a 10 μM y se preparan diluciones de muestras de cDNA en 1/8 de la siguiente manera: 2,5 μl de cDNA, adicional 17,5 μl y de agua ultrapura. Tabla x. Para el ciclado se deben programar 40 ciclos a 65°C.

Tabla 5. **Preparación del superMix ROCHE Lightcycler 480 SYBR green**

Primer cebador sentido	10μM	0.5μl
Primer cebador anti- sentido	10μM	0.5μl
Mix Roche		5μl
Total: 6μl superMix + 4μl muestra cADN + Película adhesiva		

CAPÍTULO III

RESULTADOS

RESULTADOS

Cultivo celular

En este experimento se utilizaron tres líneas celulares distintas, VERO, HEK-293T Y PDMSC, con el objetivo de analizar su comportamiento frente a tratamientos y condiciones específicas, sin embargo, cada línea fue cultivada bajo condiciones estandarizadas debido a sus diferentes comportamientos de crecimiento y morfología celular.

Las células VERO son derivadas de riñones de monos verdes africanos, Su crecimiento en cultivo se caracteriza por ser adherente (1, Figura 13), lo que significa que se adhieren a una superficie para proliferar. Para su cultivo en el laboratorio utilizamos como medio de crecimiento MEM suplementado con 10% de SFB. (1A) Su morfología es epitelial lo que significa que pueden ser alargadas o poligonales y su crecimiento en la monocapa de los frascos es uniforme, estas células a las 12 horas alcanzan una confluencia de aproximadamente un 20-30% y son generalmente un poco más pequeñas que las células HEK-293T. (1B) A las 24 horas la monocapa de crecimiento puede verse casi duplicada después de haber sido sembradas ya que alcanzan su 50-60% de confluencia, y a las 48 horas (1C) llegan a su crecimiento total 90-100% confluentes, ocupan toda la monocapa del frasco.

Las células HEK-293T son derivadas de células renales embrionarias humanas, para su cultivo utilizamos DMEM (medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% con SFB (2. Figura 13). Al igual que las VERO tiene una morfología epitelial, aunque son más redondas y menos extendidas, (2D) a las 12 horas de haber sido sembradas pueden alcanzar el 20-30% de su confluencia. Son células semi-adherentes (2E) por lo cual muchas se pueden encontrar flotando en el medio y a las 24 horas alcanzan el 50-60% de crecimiento. (2F) Estas células suelen ser más pequeñas y redondas que las VERO, con crecimiento menos uniforme y con más espacios entre ellas mismas, a las 48 horas alcanzan su confluencia máxima.

Las PDMSC son células madre mesenquimales derivadas de placenta, a diferencia de las VERO y HEK-293T, no son líneas celulares, sino células primarias. Las PDMSC fueron cultivadas en medio DMEM bajo en glucosa, ya que este tipo de DMEM es el

ideal para aquellas con un metabolismo energético bajo o que requieren una menor cantidad de glucosa para su crecimiento, como es el caso de las células primarias o células madre (3. Figura 13). Tienen una morfología característica, su forma es generalmente fibroblastoide, es decir alargadas y con extremos puntiagudos. (3G) En los frascos de cultivo son altamente adherentes a la superficie, a las 12 horas alcanzan su 20-30% de confluencia. (3H) Confluencia 50-60%, son mucho más grandes que otras células epiteliales, pero más pequeñas que otros grupos de células madre como las hematopoyéticas. (3I) Al alcanzar su máxima confluencia, 100% de crecimiento se pueden observar patrones arremolinados. Nuestros resultados demostraron en nuestros cultivos de PDMSCs una morfología fibroblástica y adherencia plástica, consistente con lo previamente publicado (Figura 15).

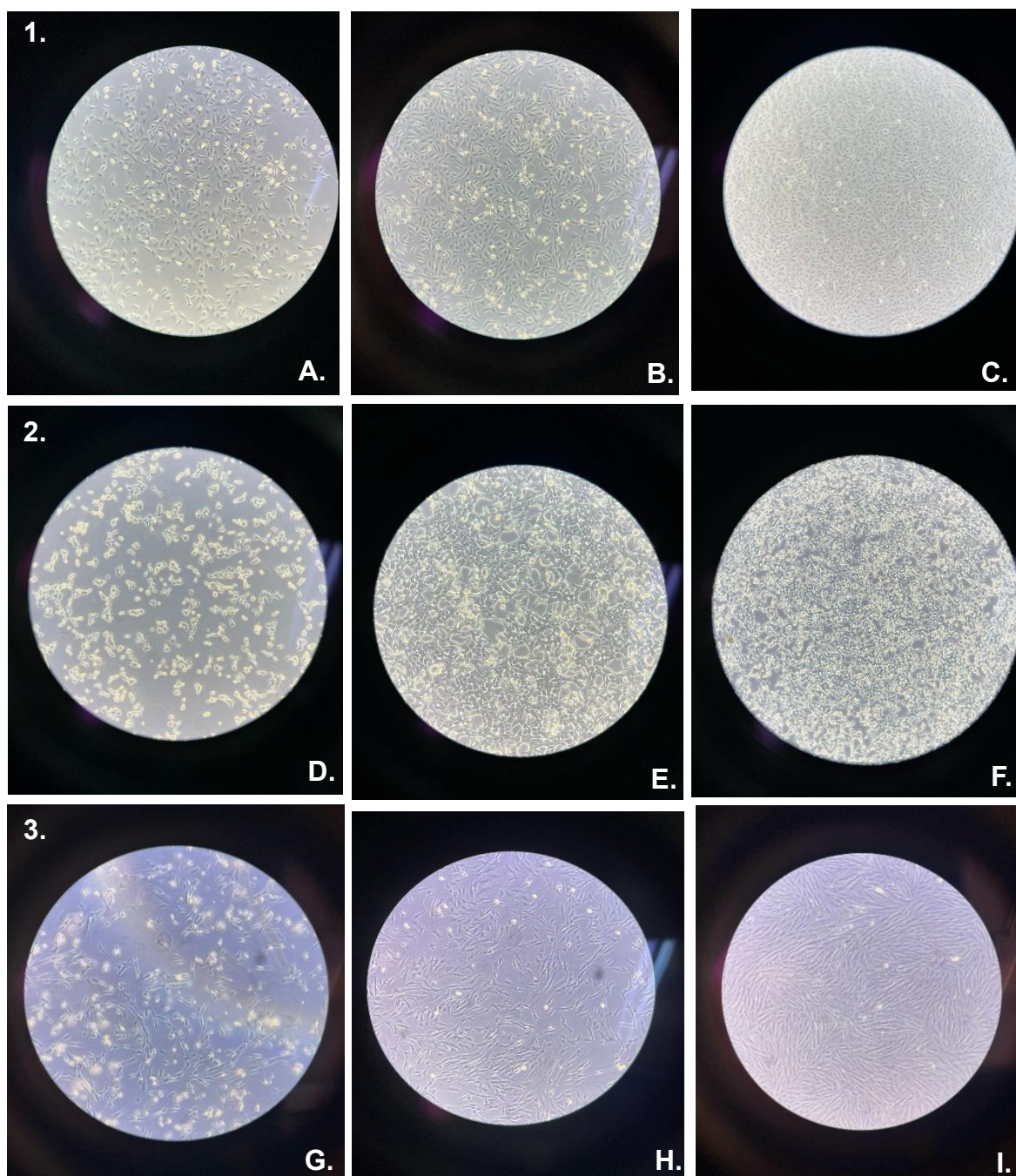


Figura 15. Morfología y crecimiento celular. (1) células VERO (ATCC ® CCL-81TM), (2) células HEK-293T (ATCC ® CRL-1573TM), (3) células PDMSC (placentarias). (A, D, E) confluencia 20-30%, (B, E, H) confluencia 50-60%. (C, F, I) confluencia 100%. Las tres células presentadas detienen su crecimiento al alcanzar el 100% de su

confluencia, sin embargo, es crucial sub-cultivarlas antes de que esto ocurra (confluencia de 80-90%), para garantizar su buen estado y que, al agregar tripsina para desprenderlas de su monocapa, estas puedan hacerlo con facilidad, sin exceder el tiempo ideal (3- 5 min) ya que esta puede ser toxica para ellas.

Producción y titulación del virus Zika

Para poder realizar los experimentos con una cantidad específica de virus infeccioso por célula y calcular la multiplicidad de infección (MOI), se realizó la titulación de ZIKV producido en VERO, en nuevas células VERO en condiciones que permitan que cada placa provenga de una partícula infecciosa. Se contaron las placas en la última dilución que se puedan contar claramente (entre 5-50 placas) y sea reproducible el duplicado. El título (en este caso, el promedio de ambas diluciones 1×10^6 y 1×10^7) fue de $4,3 \times 10^7$ PFU/mL (Figura 16).

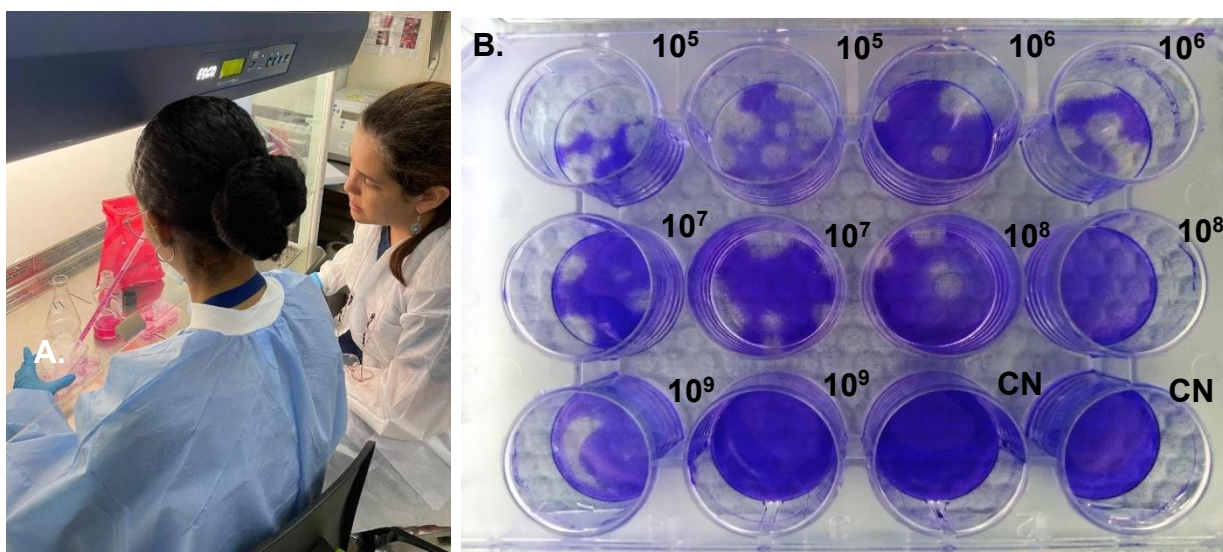


Figura 16. Titulación de ZIKV. La titulación de la infectividad del virus ZIKV se realiza en cabina de bioseguridad en un laboratorio BSL-2+ (con presión negativa, A). Se tituló ZIKV en células VERO (B) con medio y agarosa, se fijó y tiñó con cristal violeta, y se contaron las placas de las dos últimas diluciones.

Efecto del pre-tratamiento con sobrenadante sobre la replicación viral de ZIKV en células VERO y HEK-293T

Para observar un resultado replicable del comportamiento del ZIKV se realizaron dos experimentos independientes con las mismas condiciones en cuatuplicado, para ambas líneas celulares VERO y HEK-293T. Se tomó una réplica de cada experimento para demostrar la reproducibilidad de los datos, aunque los análisis estadísticos se realizaron intra-experimento y entre-experimentos.

Los cultivos fueron sometidos a 3 diferentes tratamientos para observar el efecto citopático de ZIKV antes del análisis molecular. El primer tratamiento fue (A) células con medio DMEM 10%, el segundo, (B) células con sobrenadante de PDMSC, y el tercero (C) células con sobrenadante de HEK-293T (Figuras 17 y 18).

Las dos condiciones analizadas en este experimento fueron células No infectadas y células Infectadas con ZIKV con una MOI de 2. Los tratamientos se hicieron antes de la infección y se mantuvieron durante todo el experimento. Este cultivo celular se observó a través del tiempo en diferentes horas: para VERO 24, 48 y 72 horas (Figura 14) y para HEK-293T 24, 48, 72 horas y día 5 (Figura 18).

Los resultados evidenciaron que en las dos líneas celulares VERO y HEK-293T No infectadas cultivados en su medio de crecimiento (Figuras 14 y 15, No infectadas, A) mostraron un crecimiento homogéneo, su morfología típica y debido a su alta confluencia se observaron células muertas (puntos brillantes) que resultan ser signos comunes por estrés celular. Las células no infectadas, tratadas con sobrenadante confluente de (C) HEK-293T presentaron un crecimiento similar a las tratadas con DMEM 10%, sin embargo, comparándolas a las tratadas con sobrenadante de PDMSC (B), estas últimas contaban con un mejor aspecto morfológico presentan mejor crecimiento morfológico a través del tiempo y hay menos muerte celular.

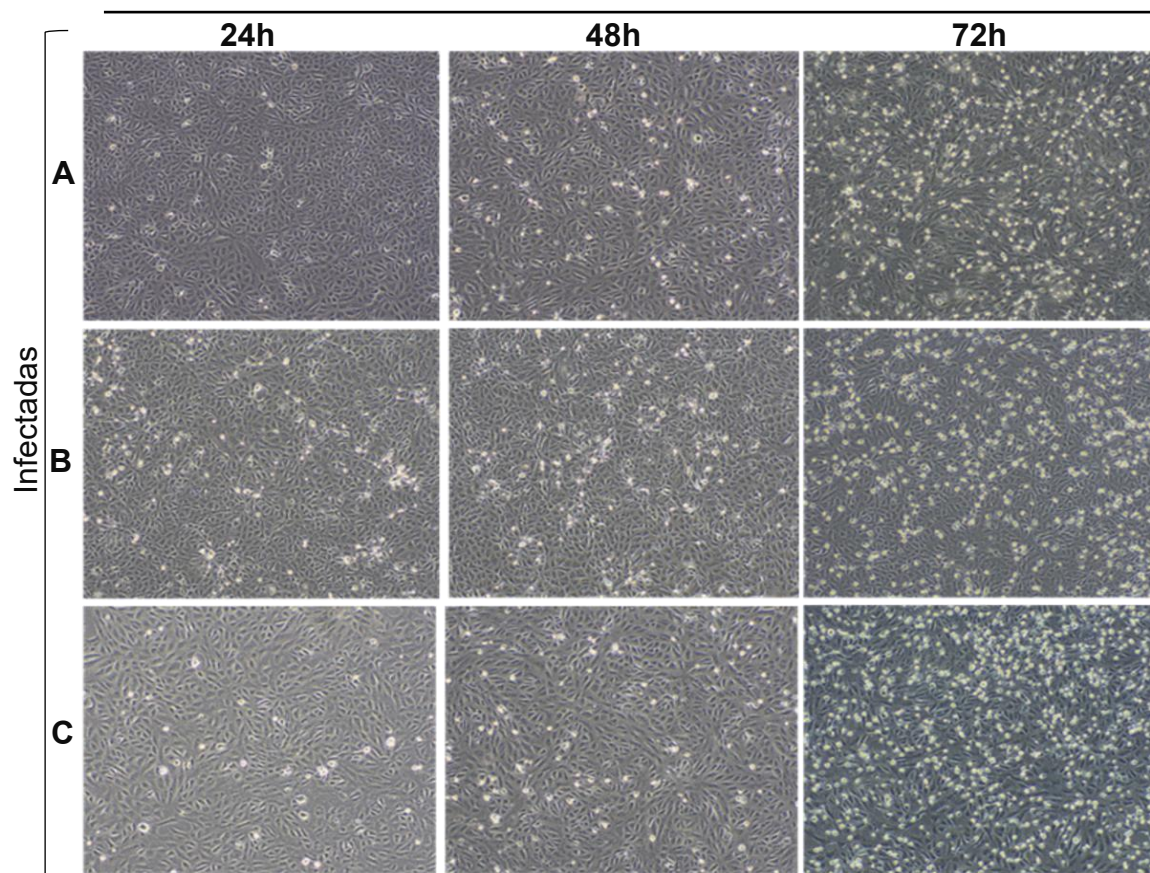
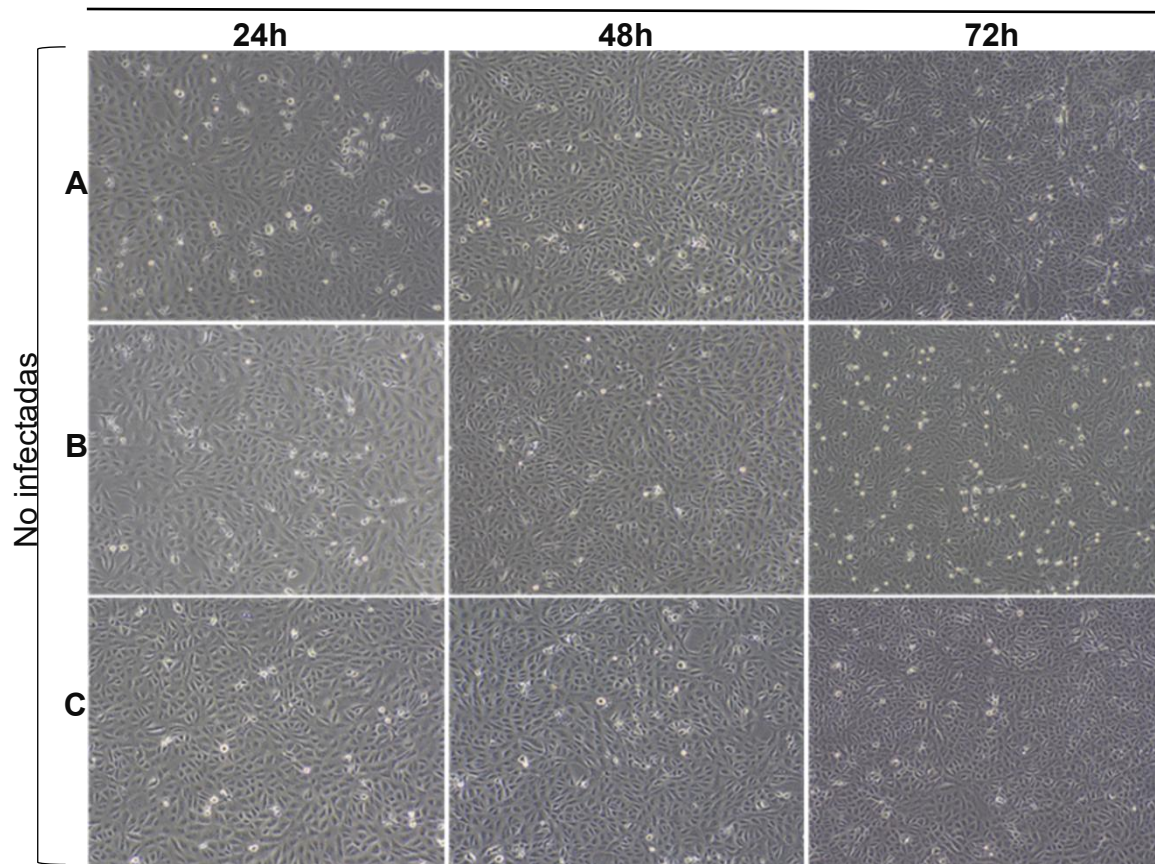


Figura 17. Efecto de sobrenadantes en células VERO. Las células No infectadas (paneles superiores) e infectadas por ZIKV (panel inferiores) tratadas con el medio de cultivo DMEM (A, control), el sobrenadante confluyente de PDMSC (B) o con (c) el sobrenadante confluyente de HEK-293T, son observadas para describir el efecto citopático a través del tiempo (24h, 48h, 72h).

En las células VERO infectadas (Figura 17, Infectadas), se observa efecto citopático a partir de las 24h con alta mortandad para todos los tratamientos a las 72h, y a pesar de que el tratamiento con sobrenadante de PDMSC (B) tiene menos mortandad a las 48h, y el tratamiento con sobrenadante de HEK-293T (C) parece tener un poco más de focos de infección a las 24h, no hay diferencia significativa entre los tratamientos. El crecimiento celular de las HEK-293T (Figura 18) fue seguido de manera más prolongada, lo que hizo que las células presentaran una mayor confluencia. En las células no infectadas (Figura 18, panel superior) se observa efecto citopático debido al sobrecrecimiento a partir de las 24h, siendo este más intenso en las células tratadas con el sobrenadante de PDMSC (B), comparado a las células tratadas con medio (A) o sobrenadante de HEK-293T, sobre todo a las 72h. Las células HEK-293T tienen la característica de ser mucho más resistente que las VERO a la infección por ZIKV, por ello vimos resultados hasta el día 5 pos-infección. En las células infectadas (Figura 18, panel inferior), tanto en el tratamiento con sobrenadante de (C) HEK-293T como el aquellas que contenían (A) medio DMEM 10% se registró foco de infección similar, mientras que en las tratadas con (B) sobrenadante confluyente de PDMSC unos focos de infección menos visibles al inicio, pero sin diferencia significativa entre los 3 tratamientos.

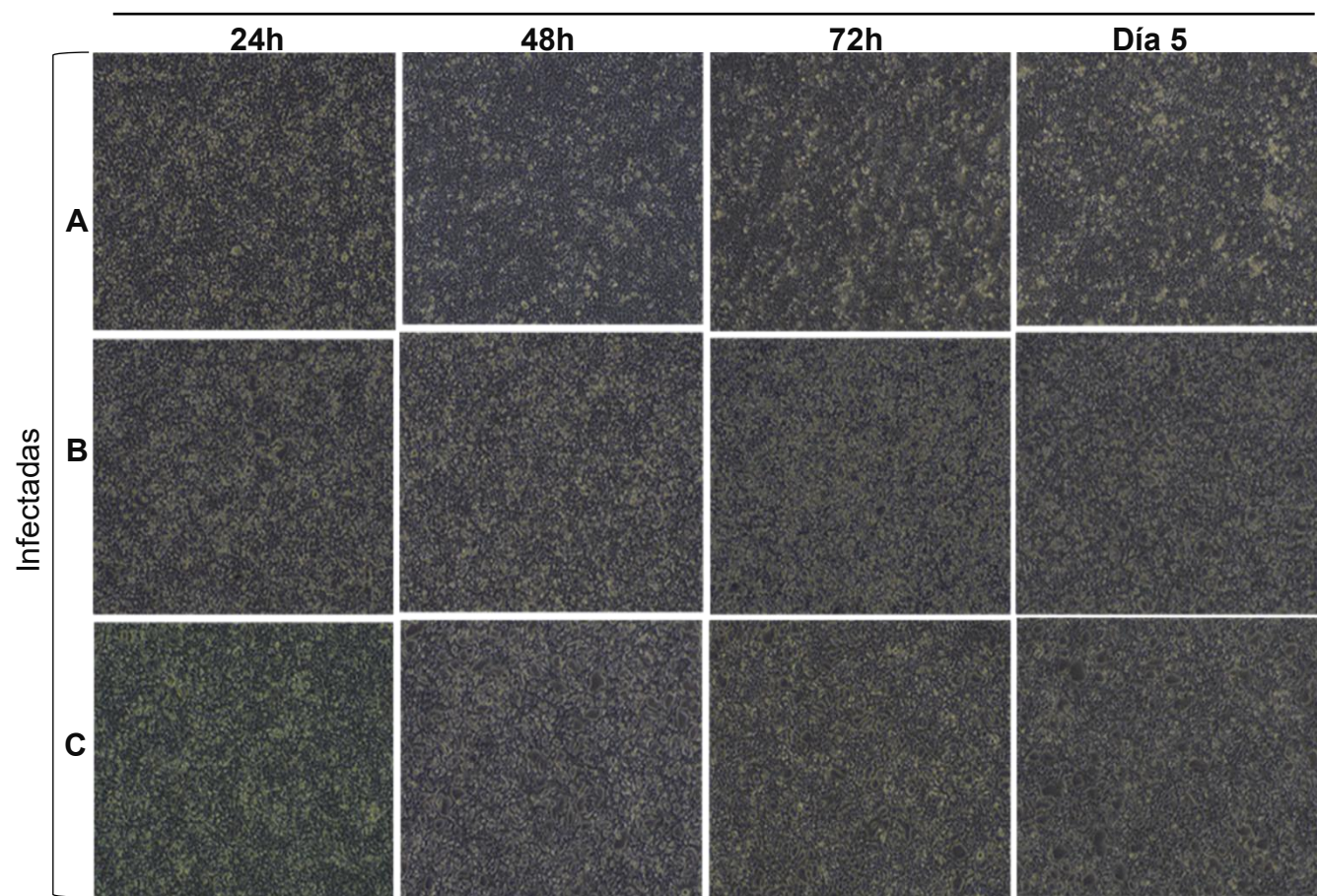
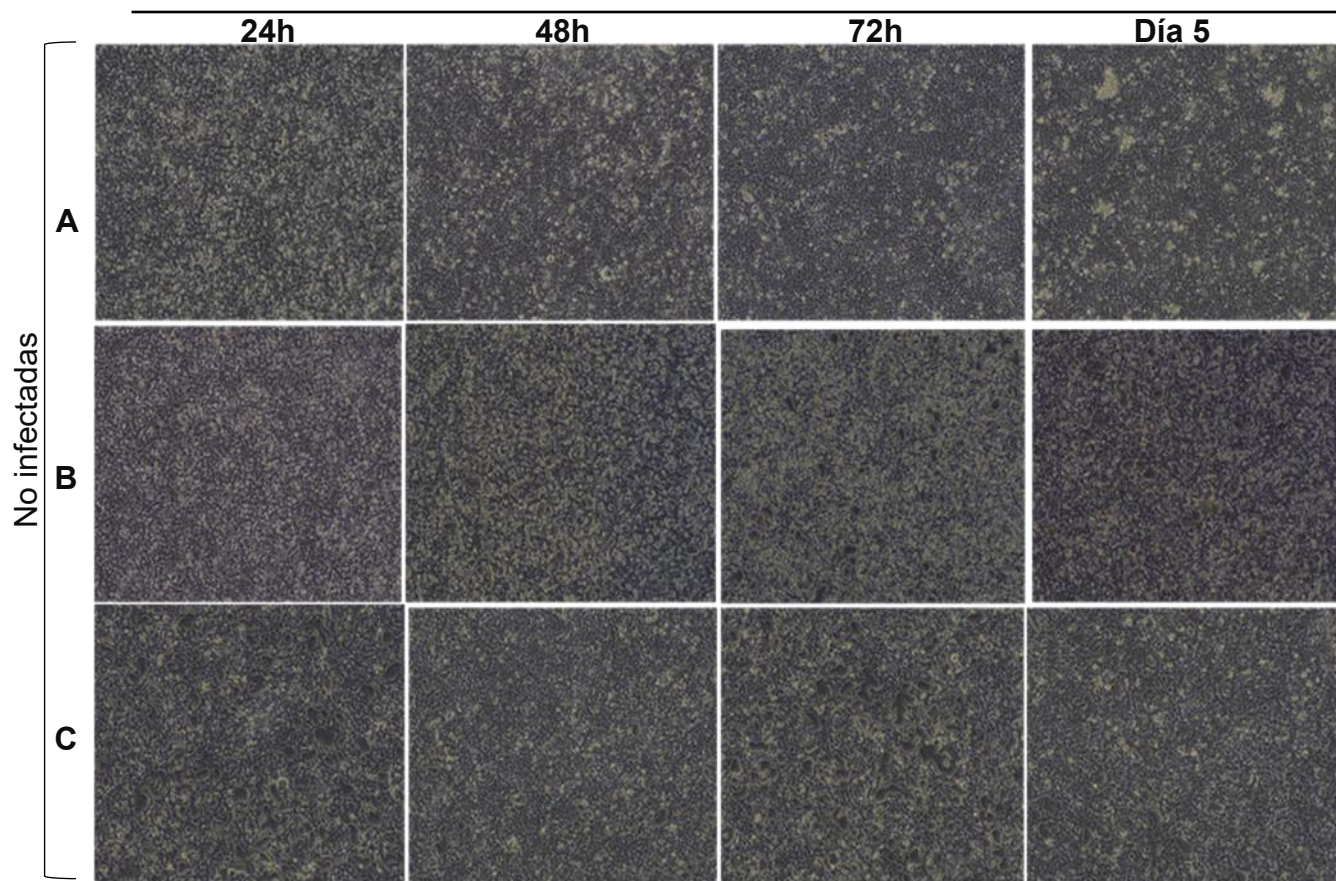


Figura 18. Efecto de sobrenadantes en células HEK-293T. Las células HEK-293T No infectadas (panel superior) e infectadas por ZIKV (panel inferior) son observadas hasta 5 días para describir el efecto citopático inducido.

ZIKV indujo un efecto citopático tanto en las células VERO y HEK-293T infectadas, y no se observó una diferencia significativa entre las células pre-incubadas con medio, sobrenadante de PDMSC y sobrenadante de HEK-293T, lo sugiere que las moléculas que se encuentran en los sobrenadantes no inhiben el efecto citopático inducido por el virus Zika.

Para determinar de una manera más cuantitativa si realmente los sobrenadantes tienen algún efecto o no sobre la infección por ZIKV, se cuantifica la carga viral a través del tiempo en ambas líneas celulares.

Se observa replicación viral con carga viral detectable en VERO infectadas con ZIKV a una MOI 2 en todas las condiciones (Figura 19). La carga viral en las células VERO tratadas con el sobrenadante de PDMSC es superior a la carga viral en las células controles cultivadas con medio para los todos los tiempos analizados, y esta diferencia es estadísticamente significativa a las 24h ($p=0.006$ (**)) y 72h ($p=0.002$ (**)), pero a las 48h presento una ligera significancia ($p=0.008$ (ns)) (Figura 19, **A**). En efecto, se observa que en las 24h, ZIKV replica mejor en presencia del sobrenadante de PDMSC llegando a la carga viral una meseta de alrededor de 3.5×10^7 copias/mL que se mantiene hasta las 72h (Figura 19, **B**). Esto sugiere que a pesar de que el efecto citopático es igual o menor, la replicación viral es mejor en presencia de sobrenadante de PDMSC. Al contrario, el sobrenadante de HEK-293T disminuye la carga viral en todos los tiempos (Figura 19, **A**), aunque la diferencia es mínima a las 48h y 72h, con un pico de carga viral de 2 y 1×10^7 copias/mL, respectivamente, que va disminuyendo lentamente, probablemente porque las células están muriendo, confirmando lo observado cualitativamente con el efecto citopático (Figura 17).

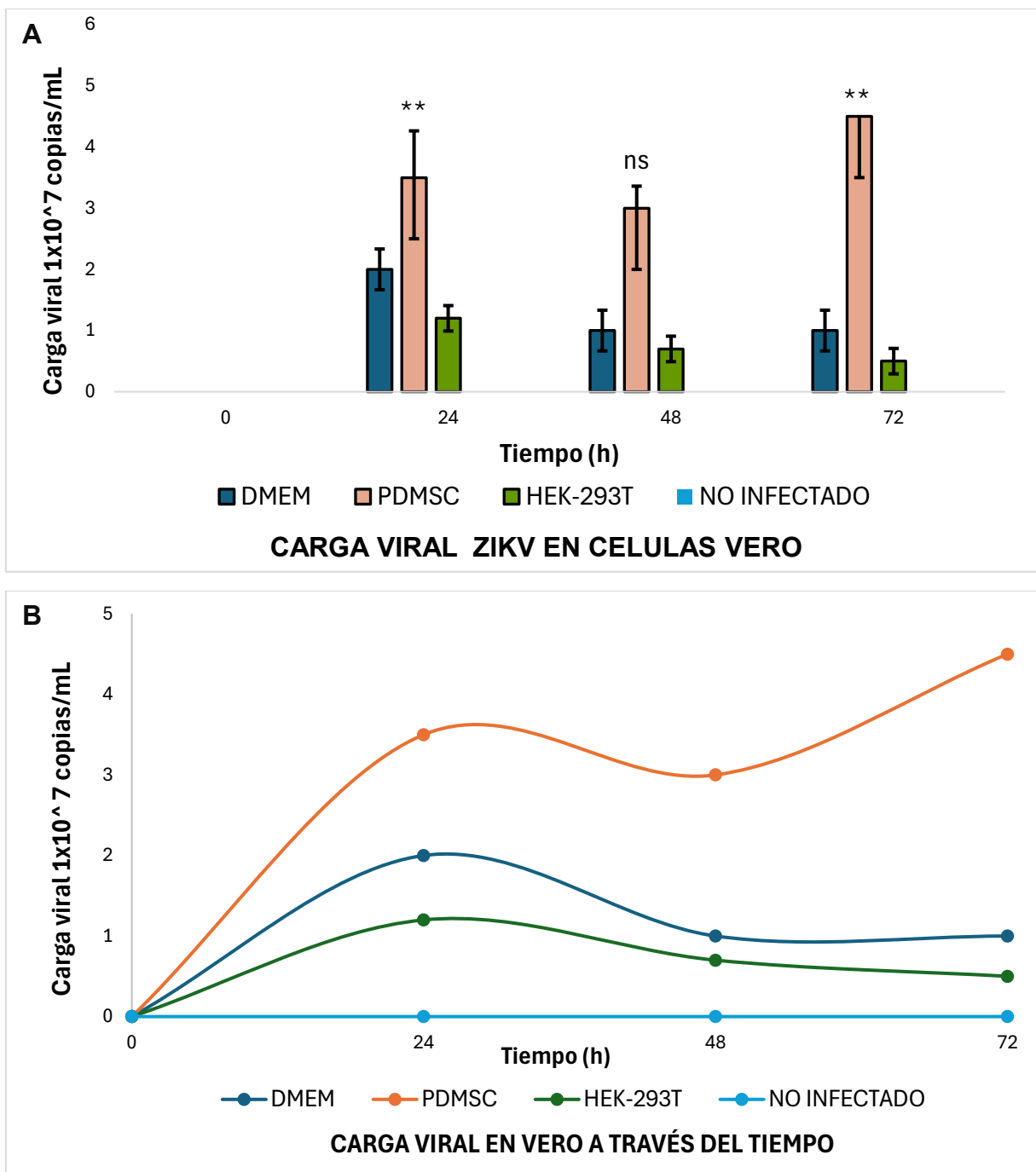
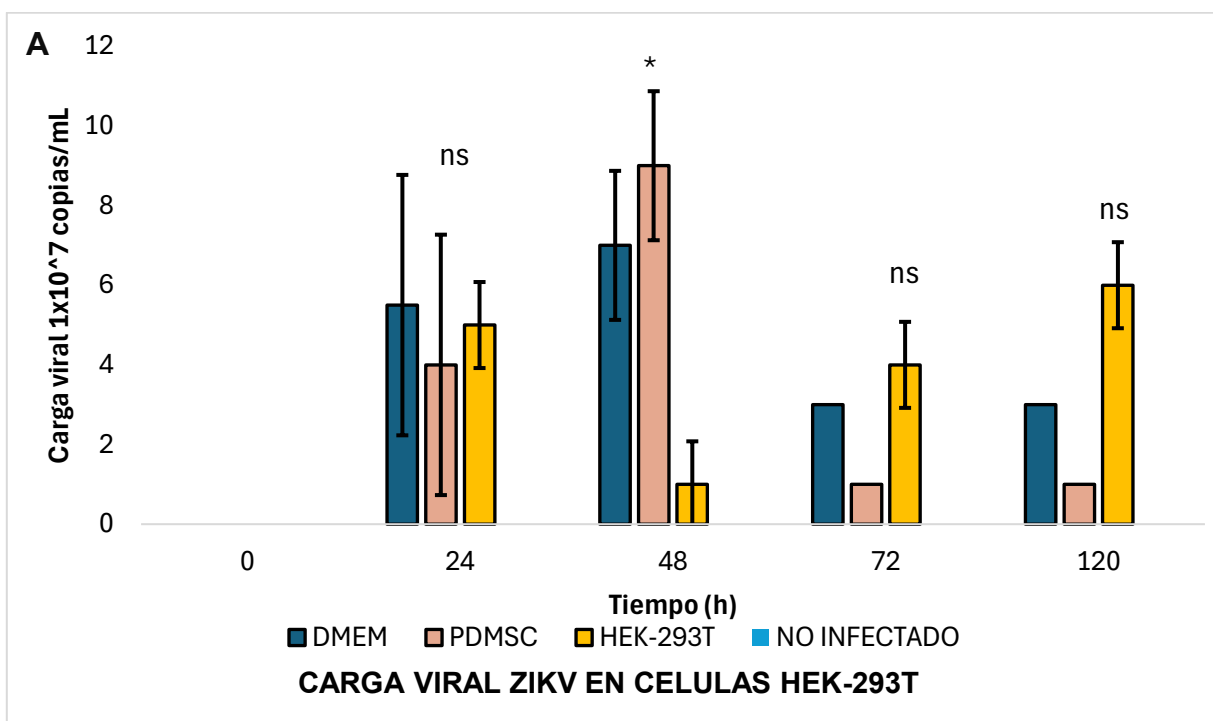


Figura 19. Carga viral en células VERO infectadas por ZIKV a través del tiempo. En el sobrenadante de las células VERO infectadas por ZIKV a una MOI de 2, se cuantifica por RTqPCR la carga viral en las células tratadas con DMEM, sobrenadante de PDMSC o de HEK-293T, como se muestra en la gráfica de barras **(A)** y en las curvas **(B)**.

De manera similar, se analizó la carga viral a través del tiempo en las células HEK-293T infectadas con ZIKV (Figura 20) a una MOI 2, y esta vez no se observa una diferencia significativa entre los tratamientos a ninguno de los tiempos analizados (24h ($p=0.983$, (ns), 72h ($p=0.230$ (ns)) y 120h ($p=0.333$ (ns)). A las 48h, parece haber una diferencia significativa entre la carga viral baja en las células tratadas con el sobrenadante de HEK-293T comparado a las células tratadas con medio o sobrenadante de PDMSC ($p=0.034$ (*)), aunque puede ser un problema técnico experimental con el punto 48h con el sobrenadante de las HEK-293T ya que este punto es más bajo que los puntos anteriores (24h) o posteriores (72h, 120h) con este mismo tratamiento (Figura 20, **A**). Hay una gran variabilidad en el experimento con las HEK-293T y las diferencias entre las 3 condiciones son mínimas a través del tiempo, con la excepción del punto 48h para el sobrenadante de HEK-293T que podría ser un artefacto experimental (Figura 20, **B**). Esto sugiere que en el caso de las células HEK-293T, no hay diferencias significativas entre los tratamientos, similar a lo observado en la descripción cualitativa del efecto citopático en las células (Figura 18).



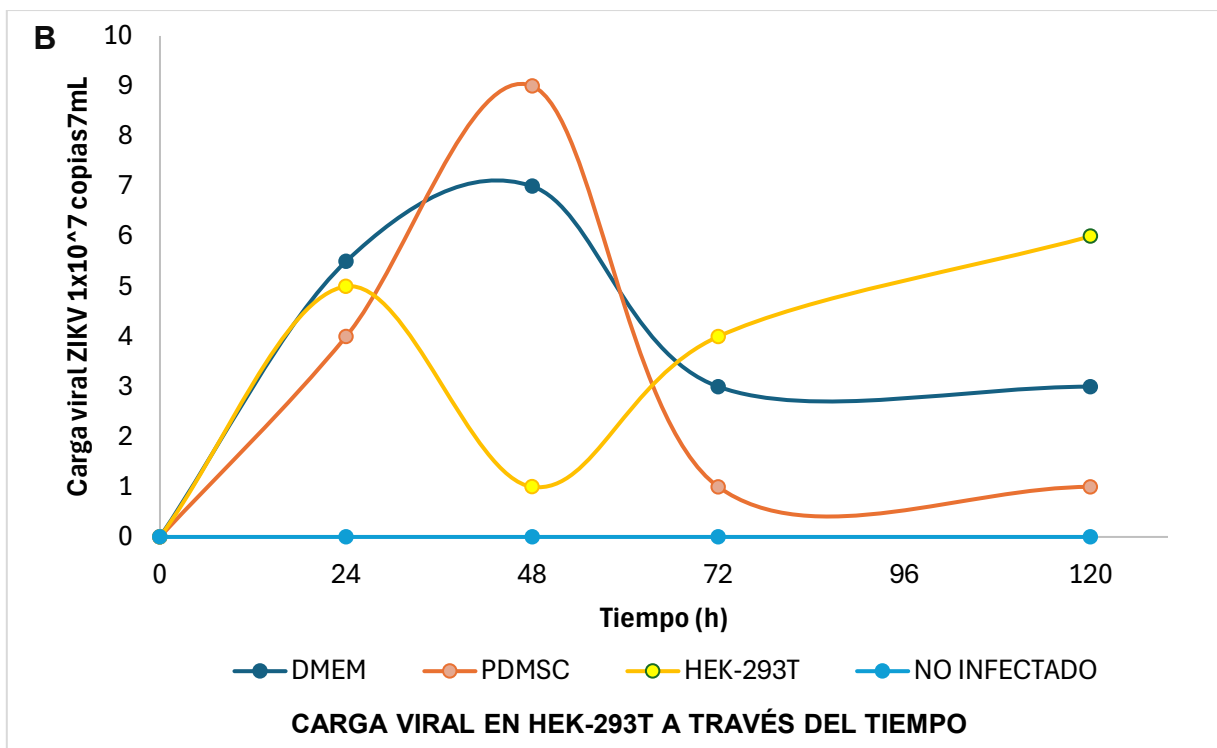


Figura 20. Carga viral en células HEK-293T infectadas por ZIKV a través del tiempo. En el sobrenadante de las células HEK-293T infectadas por ZIKV a una MOI de 2, se cuantifica por RTqPCR la carga viral en las células tratadas con DMEM, sobrenadante de PDMSC o de HEK-293T, como se muestra en la gráfica de barras **(A)** y en las curvas **(B)**.

Efecto de ZIKV en células PDMSC

Resultados previos de estudios en curso del equipo de investigación muestran que la línea celular de placenta JAR WT resiste parcialmente a la infección por ZIKV gracias al grupo de miARN C19MC, ya que las células JAR KO C19MC que no pueden expresar el clúster son más sensibles a la infección. Este efecto antiviral de las JAR WT parece poder ser transferido parcialmente a células susceptibles a través de su sobrenadante que contiene varias moléculas, entre ellas los miARN C19MC y vesículas extracelulares que los contienen. A pesar de que el sobrenadante de las células PDMSC no parece tener actividad protectora en células susceptibles, y, al contrario, en el caso de las VERO, parece aumentar la carga viral sin inducir un efecto citopático mayor, quisimos verificar si las PDMSC, siendo células primarias de

placenta, también expresan el grupo de miARNs C19MC (Figura 18). En el caso de no tener una expresión basal, también quisimos verificar si la infección por ZIKV induce o no la expresión de este grupo de miARNs, para esto se midió por RTqPCR en las células la expresión del intron 7 del pre-miARN del grupo C19MC verificando la presencia de ARN celular con la detección del mRNA del gen β -actina, al mismo tiempo que se detectó el ARN viral de ZIKV en el sobrenadante y un control no infectado para medir dicho porcentaje de inducción. La infección se realizó con una MOI de 10 debido a la resistencia al virus de las PDMSC.

A pesar de detectar claramente el mRNA del gen de la β -actina mostrando que hay una buena cantidad de ARN celular, no se pudo detectar la expresión del intron 7 del pre-miARN C19MC en las PDMSC (Figura 21). Se pudo detectar la infección por ZIKV a partir de las 6h pos-infección hasta las 48h, y la presencia de ZIKV no indujo la expresión del grupo de miARN C19MC.

Incluir descripción del efecto de ZIKV en la citotoxicidad/resistencia en PDMSCs (aunque sea descriptivo de los resultados de Dimelza).

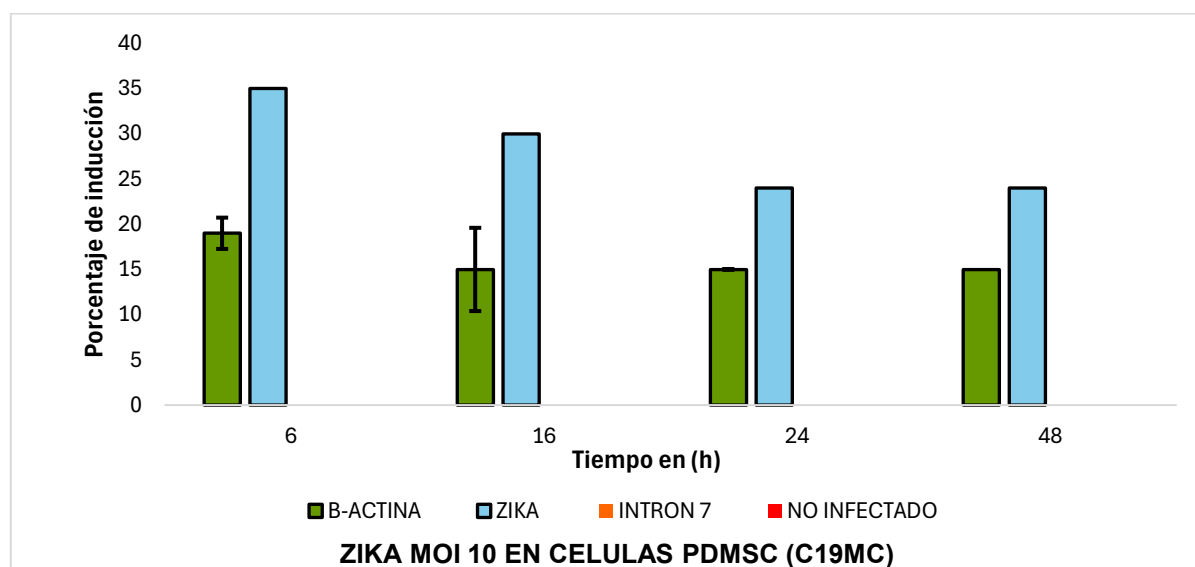


Figura 21. Análisis de la expresión del grupo C19MC de miARNs en células PDMSC infectadas con ZIKV. Se detectó a través del tiempo la expresión por RTqPCR del intron 7 del pre-miARN del grupo de miARNs C19MC, del mRNA del gen de la β -actina, y del ARN viral de ZIKV en células PDMSC infectadas por ZIKV con una MOI 10.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En este estudio se comparó el efecto citopático inducido por el virus del Zika en las líneas celulares VERO y HEK-293T en presencia de diferentes condiciones con el fin de determinar si las células de placenta PDMSC tenían la capacidad de proteger contra la infección por ZIKV a estos dos tipos de células susceptibles al virus. Se conoce que los sobrenadantes de las PDMSC tienen altas propiedades para las células como ayudar a reducir el estrés celular evitando la muerte (Kusuma GD, *et al.*, 2021), este sobrenadante podría tener un efecto protector ante la presencia del virus gracias a sus importantes componentes secretados. Nuestros resultados muestran que, en los cultivos pre-tratados de células VERO con los sobrenadantes, presentaron mayor infección por ZIKV a partir de las 24h de inoculación, mientras que en HEK-293T el efecto citopático fue más tardío, siendo notorio a partir de las 48h. El hecho de que ambos sobrenadantes tengan efectos similares sugiere que, en estas condiciones experimentales, no hay un efecto específico del sobrenadante de las PDMSC sobre la permisibilidad y/o la respuesta antiviral de las células susceptibles VERO y HEK-293 a la infección.

En nuestro estudio, el sobrenadante de las PDMSC jugó un rol mínimo en la actividad antiviral, aunque tuvo un efecto protector contra el efecto citopático que fue ligeramente menor en presencia del sobrenadante de PDMSC, sugiriendo que protege parcialmente de la muerte celular las células infectadas. Tras evidenciar este efecto diferencial según los tratamientos, observamos que los sobrenadantes, provenientes de células confluentes, tienen menos nutrientes que en comparación con un medio nuevo debido a que ya las células confluentes lo utilizaron para su crecimiento, sin embargo, el hecho de que haya una disminución leve del efecto citopático, sugiere que posiblemente los mismos nutrientes, vesículas extracelulares y moléculas liberadas por las células PDMSC se conservan en el sobrenadante. Estudios previos muestran que las PDMSC tienen la capacidad de regular la vía de apoptosis de otras células a través de diversas moléculas secretadas y vesículas extracelulares (Chen, Z., Xia, X., M. *et al.*, 2024). Estudios a futuro son necesarios para determinar si esta inhibición parcial del efecto citopático se debe a una acción antiviral menor o a un

efecto directo en la vía de inhibición de la muerte celular en las células receptoras infectadas.

El hecho de que la carga viral fue mayor en presencia del sobrenadante de PDMSC en células VERO infectadas por ZIKV, sugiere que el sobrenadante de PDMSC es capaz de modular la respuesta viral, aumentando la permeabilidad de las células a la infección o la replicación del ZIKV en las células. Este efecto observado fue contrario a una hipótesis inicial de una actividad antiviral robusta transmitida por las PDMSC. Estudios futuros deben profundizar este tema y determinar cuál es el mecanismo implicado y la(s) molécula(s) que permite(n) observar este efecto. La modulación de la respuesta inmune o de la replicación viral podría deberse a las moléculas solubles que presenta el sobrenadante de PDMSC, como los exosomas, citocinas, miARN que suelen ser características de estas células de placenta; será importante determinar si las moléculas implicadas en el aumento de la carga viral son las mismas o no que las moléculas implicadas en la disminución del efecto citopático debido a la infección, si estos mecanismos son antagonistas, sinérgicos o totalmente independientes.

Nuestros resultados muestran que el sobrenadante de PDMSC no parece tener la capacidad de transmitir un efecto protector antiviral fuerte en las células susceptibles analizadas, al contrario de nuestra hipótesis. Esta hipótesis del efecto protector antiviral de sobrenadantes de células de placenta estaba basada en los resultados previos obtenidos con las células JAR, que no solo son resistentes a la infección viral, sino que pueden transferir parcialmente esta resistencia a células susceptibles. Al contrario, el sobrenadante de las PDMSC parece tener un ligero efecto amplificador de la infección por ZIKV en VERO. A pesar de que ambas células JAR y PDMSC, son originarias de placenta, hemos demostrado que las PDMSC, al contrario de las JAR WT, no expresan el grupo de miARNs C19MC y este no es inducido por la infección por ZIKV. El hecho de que las PDMSC no expresan C19MC, apoya la propuesta de que los trofoblastos son las células de placenta responsables de la expresión de C19MC y que este clúster tiene un rol crucial en la diferenciación de trofoblastos (Donker RB *et al.*, 2012). Mientras que otros estudios sugirieron que las células estromales mesenquimales derivadas de la placenta (PDMSC), y células madre/progenitoras también expresan el clúster C19MC (I. Flor, A. Neumann, C. Freter

et al., 2012), lo que no fue observado en nuestras condiciones experimentales. Estudios futuros son necesarios para determinar cuál es el efecto de los sobrenadantes de PDMSC en células receptoras, cuáles son las moléculas responsables de los mismos, y si otros miARNs y no los del grupo de miARNs C19MC, están implicados.

Nuestros resultados sugieren que, bajo ciertas condiciones, el sobrenadante de células madre de placenta no necesariamente confiere resistencia antiviral a células susceptibles, como HEK-293T y Vero. Proponemos que esta discrepancia pudiera deberse a una variabilidad en la expresión del clúster C19MC, diferencias en el perfil secretor de las células madre utilizadas, o un posible efecto inmunomodulador que favorece la replicación viral. Esto abre la posibilidad de que, en lugar de actuar siempre como barrera antiviral, las células madre puedan, en ciertos contextos, facilitar la infección al modular negativamente la respuesta antiviral de las células receptoras. En conjunto, estos resultados preliminares muestran que las células de placenta que no expresan C19MC, como las PDMSC, no logran transferir una resistencia parcial antiviral a células susceptibles en el contexto de nuestro experimento *in vitro*, lo que sugiere que los miARN de este clúster tienen un rol antiviral importante. El sobrenadante de las PDMSC no tiene el efecto de modular la infectividad en las células receptoras HEK-293T, pero parece tener un efecto positivo en la infección de las células VERO aumentando la carga viral. El efecto del sobrenadante de las PDMSC es muy diferente al efecto observado con las células JAR WT derivada de trofoblastos, que sí expresan el grupo de miARNs C19MC y que tienen un efecto antiviral en diferentes modelos de células susceptibles. Esto sugiere la importancia de estos miARNs en la respuesta antiviral no solo de la misma célula de placenta sino también en la transferencia de la resistencia a otras células susceptibles placentarias y no placentarias.

CONCLUSIONES

1. Las células HEK-293T son más resistentes que las VERO al efecto citopático a la infección por ZIKV.
2. ZIKV indujo un efecto citopático en las células VERO y HEK-293T, se observa un efecto mínimo protector contra la muerte celular del sobrenadante de PDMSC, sin una diferencia significativa entre las células pre-incubadas con los diferentes sobrenadante.
3. El sobrenadante de PDMSC no tiene un efecto antiviral significativo sobre las células VERO y HEK-293T infectadas con ZIKV, aunque parece favorecer parcialmente la replicación viral en las VERO.
4. Las PDMSC no expresan el grupo de miRNA C19MC.
5. En conjunto, los resultados preliminares muestran que las células de placenta que no expresan el grupo de miARNs C19MC, como las PDMSC, no transfieren un efecto protector antiviral claro a otras células.

RECOMENDACIONES

1. Se necesitan nuevos estudios para identificar y analizar la respuesta antiviral de las PDMSC comparándolas con células susceptibles como VERO y HEK-293T.
2. Se requiere un diseño experimental para determinar la diferencia en la respuesta inmune entre las células de placenta que expresan C19MC o no y si existe un rol de otros miARN.
3. Se requieren experimentos de virología tradicional como la infectividad de los virus producidos por las células tratadas con diferentes sobrenadantes antes y/o durante la infección para corroborar los resultados obtenidos en esta investigación.
4. Integración de qPCR para miARNs de los grupos de miARN más importantes en las células de placenta y no solo el grupo específico C19MC.
5. Del punto de vista técnico, trabajar la gama de plásmido ZikPan cuidadosamente y sin exceder más de 3 descongeladas para garantizar una óptima eficiencia en los resultados de carga viral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo, O., & Neumark, D. (2017). Adebayo y Neumark, 2017; Gyawali y Bradbury, 2016; O'Reilly et al., 2018). Virus Zika en una Juerga de Difusión: lo que ahora sabemos que era desconocido en la década de 1950 *Viol. J.*, 13 (1) (2016), p. 165, 10.1186/s12985-016-0623-2
- Alcón, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas específico para la proteína NS1 no estructural del virus del Dengue tipo 1 revela la circulación del antígeno en la sangre durante la fase aguda de la enfermedad en pacientes que experimentan infecciones primarias o secundarias. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 376-381.
- Araujo, T. V. B., Ximenes, R. A. A., Miranda-Filho, D. B., Souza, W. V., Montarroyos, U. R., de Melo, A. P. L., et al. (2018). Asociación entre Microcefalia, infección por el virus del Zika y otros factores de riesgo en Brasil: Informe final de un estudio de control de casos. *Infectious Diseases*, 18(3), 328-336. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30727-2
- Basu, R., & Tumban, E. (2016). Virus Zika en una Juerga de Difusión: lo que ahora sabemos que era desconocido en la década de 1950. *Viol. J.*, 13(1), 165. doi: 10.1186/s12985-016-0623-2
- Basu, R., & Tumban, E. (2016). Zika virus in a social diffusion party: What we now know was unknown in the 1950s. *Virology Journal*, 13(1), 165. doi: 10.1186/s12985-016-0623-2
- Bhatnagar, J., Rabeneck, D. B., Martines, R. B., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Estetter, L. B., et al. (2017). Replicación y persistencia del ARN del virus del Zika en el cerebro y el tejido placentario. *Emerging Infectious Diseases*, 23(3), 405-414. doi: 10.3201/eid2303.161499
- Bonaldo, C. M., et al. (2016). Aislamiento del virus del zika infeccioso de la orina y la saliva de pacientes en Brasil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(6), 1–8. doi: 10.1371/journal.pntd.0004816
- Bonaldo, C. M., Ribeiro, I. P., Lima, N. S., Dos Santos, A. A., Menezis, L. S., da Cruz, S. O., et al. (2016). Aislamiento del virus del zika infeccioso de la orina y la saliva de

- pacientes en Brasil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(6), 1–8. doi: 10.1371/journal.pntd.0004816
- Boorman, J. P., & Porterfield, J. S. (1956). Una técnica simple para la infección de mosquitos con virus; transmisión del virus Zika. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 50, 238-242.
- Brasil, P., Pereira, J. P. Jr., Raja Gabaglia, C., Damasceno, L., Wakimoto, M., Ribeiro Nogueira, R. M., et al. (2016). Infección por el Virus del Zika en Mujeres Embarazadas en Río de Janeiro - Informe Preliminar. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2321-34. doi: 10.1056/NEJMoa1602412
- Cooper, H. J., Iwamoto, M., Lash, M., Conners, E. E., Paladini, M., Slavinski, S., et al. (2019). Infección materna por el virus del Zika: asociación con neonatos de la edad pequeña para la edad gestacional y nacimiento prematuro. *Obstetrics & Gynecology*, 134(6), 1197-1204. doi: 10.1097/AOG.0000000000003577
- Chen, Z., Xia, X., Yao, M. et al. The dual role of mesenchymal stem cells in apoptosis regulation. *Cell Death Dis* 15, 250 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06620-x>.
- D. Wang, W. Song y Q. Na, “Los roles emergentes de los microARN específicos de la placenta en la regulación de la proliferación del trofoblasto durante el primer trimestre”, *Revista australiana y neozelandesa de obstetricia y ginecología*, vol. 52, no. 6, págs. 565–570, 2012.
- Delorme-Axford, E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2014). La Placenta como Barrera a las Infecciones Virales. *Annual Review of Virology*, 1(1), 133-46. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085524
- Delatorre, E., Fernández, J. y Bello, G. (2018). Investigando el papel de la isla de Pascua en la migración del virus Zika desde el Pacífico Sur a América. *Emerger. Infectar. Dis.* 24:2119. doi: 10.3201/eid2411.180586
- Dick GW, Cocina SF, Sombra AJ. (1952). Virus zika. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 46(5), 509–520.
- Dick, G. W. (1952). Virus zika. II. Patogenicidad y propiedades físicas. *Trans. R Soc Trop Med Hyg*, 46, 521-534.

- Dick, G. W., Cocina, S. F., & Sombra, A. J. (1952). Virus zika. I. Aislamientos y especificidad serológica. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 46, 509-520.
- Ding, J., Huang, F., Wu, G., et al. (2015). MiR-519d-3p suprime la invasión y migración de células del trofoblasto mediante la focalización de MMP-2. *PLOS ONE*, 10(3), e0120321. doi: 10.1371/journal.pone.0120321
- Dirección General de Epidemiología. (2015). Vigilancia Epidemiológica – Semana 52, 2015. *Boletín Epidemiológico*, 32, 1-64.
- Dirección General de Epidemiología. (2016). Casos Confirmados de Infección por Virus Zika. Semana epidemiológica 16 de 2016.
- Dirección General de Epidemiología. (2016). Vigilancia Epidemiológica – Semana 2, 216. *Boletín Epidemiológico*, 33, 1-64.
- Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., et al. (2012). The expression profile of microRNA C19MC in human primary trophoblastic cells and exosomes. *Human Reproduction*, 18(8), 417-424. doi: 10.1093/humrep/des013
- Du, S., Liu, Y., Liu, J., Zhao, J., Champagne, C., Tong, L., et al. (2019). Los mosquitos *Aedes* adquieren y transmiten el virus del Zika mediante la reproducción en ambientes acuáticos contaminados. *Nat Commun*, 10(1), 1324. doi: 10.1038/s41467-019-09256-0
- Duffy SR, Chen TH, Hancock WT, et al. (2009). Outbreak of Zika virus infection, Yap State, Federated States of Micronesia, 2007. *Engl J Med*, 360(26), 2536–2543.
- Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., et al. (2009). Brote del virus del Zika en la isla de Yap, Estados Federados de Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360, 2536-2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715
- Fauci, A. S., & Morens, D. M. (2016). El virus Zika en las Américas: otra amenaza de arbovirus. *New England Journal of Medicine*, 374(7).
- Flor, I., Neumann, A., Freter, C., et al. (2012). High expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures of placental stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(3), 411-416. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.059
- Freitas, D. A., Souza-Santos, R., Carvalho, L. M. A., Barros, W. B., Neves, L. M., Brasil, P., et al. (2020). Síndrome Congénita del Zika: Una Revisión Sistemática. *PLOS ONE*, 15(12), e0242367. doi: 10.1371/journal.pone.0242367

- Gratton, R., Agrelli, A., Tricarico, P. M., Brandão, L., & Crovella, S. (2019). Autofagia en la infección por el virus del Zika: una posible diana terapéutica para contrarrestar la replicación viral. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1048. doi: 10.3390/ijms20051048
- Guzeloglu-Kayisli, O., Guo, X., Tang, Z., Semerci, N., Ozmen, A., Larsen, K., et al. (2020). Las células deciduales infectadas por el virus del Zika provocan una respuesta inmune innata gestacional dependiente de la edad y exageran la permisividad del trofoblasto del Zika: implicación para la transmisión vertical. *Journal of Immunology*, 205(11), 3083-3094. doi: 10.4049/jimmunol.2000713
- Giraldo MI, Gonzalez-Orozco M, Rajsbaum R. Pathogenesis of Zika Virus Infection. *Annu Rev Pathol*. 2023 Jan 24;18:181-203. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-031521-034739. Epub 2022 Sep 23. PMID: 36151059; PMCID: PMC10893765.
- García-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. 2016. Transacciones de ARN de Flavivirus desde la entrada viral hasta la replicación del genoma. *Antioxidantes Res*. 134:244–49
- Gyawali, B., & Bradbury, R. S. (2016). Zika virus: A review of the literature. *Journal of Medical Virology*, 88(5), 781-793. doi: 10.1002/jmv.24444
- harlier, C., Beaudoin, M. C., Couderc, T., Lortholary, O., & Lecuit, M. (2017). Arbovirus y embarazo: efectos maternos, fetales y neonatales. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 1(2), 134-146. doi: 10.1016/S2352-4642(17)30021-4
- Herrera, B. B., Chang, C. A., Hamel, D. J., Mboup, S., Ndiaye, D., Imade, G., et al. (2017). Transmisión continua del virus del Zika en humanos en África Occidental, 1992-2016. *Journal of Infectious Diseases*, 215(10), 1546-1550. doi: 10.1093/infdis/jix182.
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R., & Tinte, C. (2016). Zika: el origen y la propagación de un virus transmitido por mosquitos. *Bulletin of the World Health Organization*.
- Krauer, F., Riesen, M., Reveiz, L., Oladapo, T. O., Martínez-Vega, R., Porgo, V. T., et al. (2017). Zika virus infection as a cause of congenital brain anomalies and Guillain-Barré syndrome: A systematic review. *PLoS Medicine*, 14(1), e1002203. doi: 10.1371/journal.pmed.1002203

- Kuno, G., & Chang, G. J. (2005). Transmisión biológica de arbovirus: reexamen y nuevos conocimientos sobre componentes, mecanismos y rasgos únicos, así como sus tendencias evolutivas. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 608-637. doi: 10.1128/CMR.18.4.608-637.2005
- Kusuma GD, Georgiou HM, Perkins AV, Abumaree MH, Brennecke SP, Kalionis B. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Role in Oxidative Stress Associated with Preeclampsia. *Yale J Biol Med*. 2022 Mar 31;95(1):115-127.
- Seok J, Jun S, Cho J, Park S, Lee JO, Kim GJ. Human placenta-derived mesenchymal stem cells induce trophoblast invasion via dynamic effects on mitochondrial function. *J Cell Physiol*. 2021 Sep;236(9):6678-6690. doi: 10.1002/jcp.30330.
- Leon-Juarez, M., Martinez-Castillo, M., Gonzalez-Garcia, L. D., Helguera-Repetto, A. C., Zaga-Clavellina, V., Garcia-Cordero, J., et al. (2017). Mecanismos Celulares y Moleculares de Infección Viral en la Placenta Humana. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(7), 93-108. doi: 10.1093/femspd/ftx093
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., & Chen, C. (2007). Caracterización de los perfiles de expresión de microARN en tejidos humanos normales. *BMC Genomics*, 8, artículo 166. doi: 10.1186/1471-2164-8-166
- Li A, Yu J, Lu M, Ma Y, Attia Z, et al. 2018. Una vacuna contra el virus del Zika que expresa poliproteína NS1 de la premembrana. *Nat. Commun*9:3067
- Lin, H. H., Yip, B. S., Huang, L. M., & Wu, S. C. (2018). Biología estructural del virus del Zika y progreso en el desarrollo de vacunas. *Biotechnol Adv*, 36, 3647–53. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.008
- Lin, S., Cheung, W. K. C., Chen, S., et al. (2010). Computational identification and characterization of primate-specific microRNAs in the human genome. *Computational Biology and Chemistry*, 34(4), 232-241. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2010.04.001
- Lustig, Y., & Mendelson, E. (2016). Detección de ARN del virus del Zika en sangre completa de casos de enfermedad por el virus del Zika importados hasta 2 meses después del inicio de los síntomas, Israel, diciembre de 2015 a abril de 2016. *Euro Surveill*, 21(26), 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30269

- Macnamara, F. N. (1954). Virus del Zika: un informe sobre tres casos de infección humana durante una epidemia de ictericia en Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48, 139-145.
- Magnus, M. M., Esposito, D. L. A., Costa, V. A. D., Melo, P. S., Costa-Lima, C., Fonseca, B., & Addas-Carvalho, M. (2018). Riesgo de transmisión del virus Zika por donaciones de sangre en Brasil. *Hematol Transfus Celular Ter*, 40(3), 250-254. doi: 10.1016/j.htct.2018.01.011
- Martínez, J. D., Garza, J. A. C., & Cuéllar-Barboza, A. (2019). Going Viral 2019: Zika, Chikungunya y Dengue. *Dermatología Clínica*, 37(95), 105.
- Mercado-Reyes, M., Gilboa, S. M., Valencia, D., Daza, M., Tong, V. T., Galang, R. R., et al. (2021). Embarazo, nacimiento, infancia y primera infancia: Resultados de neurodesarrollo entre una cohorte de mujeres con síntomas de enfermedad por el virus del Zika durante el embarazo en tres sitios de vigilancia, Proyecto Vigilancia De Embarazadas Con Zika (VEZ), Colombia, 2016-2018. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 183-199. doi: 10.3390/tropicalmed6040183
- Monaghan, A., Morin, C., Steinhoff, D., et al. (2016). Sobre la ocurrencia estacional y la abundancia del mosquito vector del virus Zika *Aedes aegypti* en los Estados Unidos contiguos. *PLOS Currents Outbreaks*, 8.
- Morales-Prieto, D. M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., et al. (2012). MicroRNA expression profiles in trophoblastic cells. *Placenta*, 33(9), 725-734. doi: 10.1016/j.placenta.2012.05.013
- Morales-Prieto, D. M., Schleussner, E., & Markert, U. R. (2011). Down-regulation of miR-141 by the leukemia inhibitory factor inhibits proliferation in the JEG-3 choriocarcinoma cell line. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66(1), 57-62. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01013.x
- Mouillet, J. F., Chu, T., & Sadovsky, Y. (2011). Placental microRNA expression patterns. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 91(8), 737-743. doi: 10.1002/bdra.20794
- Musso D, Gubler DJ. (2016). Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*, 29(3), 487–524. doi: 10.1128/CMR.00072-15. PMID: 27029595; PMCID: PMC4861986.

- Musso, D., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Yan Shan, A., Cao-Lormeau, V. M., & Brout, J. (2014). Potencial para la Transmisión del Virus Zika a través de la Transfusión de Sangre Demostrado durante un Brote en la Polinesia Francesa, noviembre 2013 a febrero 2014. *Vigilancia.org*.
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2018). Zika virus: History and basic biology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(3), e00047-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-17>
- Nhan TX, Musso D. (2015). Emergence of Zika virus. *Virologie (Montrouge)*, 19(5), 225–235. English. doi: 10.1684/vir.2015.0622. PMID: 32260029.
- Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefèvre A, Coullin P, Moore GE, Cavaillé J. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet*. 2010 Sep 15;19(18):3566-82. doi: 10.1093/hmg/ddq272.
- Organización Panamericana de la Salud. (2015). Casos acumulados sospechosos y confirmados reportados por países y territorios en las Américas. Recuperado de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10548:2015-02-26-11-51-45&Itemid=3966
- Pereira, L. (2018). Infección Viral Congénita: Atravesando la Interfaz Uterino-Placentaria. *Annual Review of Virology*, 5(1), 273-99. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043236
- Petersen, E. E., Polen, K. N., Meaney-Delman, D., et al. (2016). Actualización: orientación provisional para los proveedores de atención médica que atienden a mujeres en edad reproductiva con posible exposición al virus del Zika – Estados Unidos, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65, 315-322.
- Peng ZY, Yang S, Lu HZ, Wang LM, Li N, Zhang HT, Xing SY, Du YN, Deng SQ. A review on Zika vaccine development. *Pathog Dis*. 2024 Feb 7;82:ftad036. doi: 10.1093/femspd/ftad036. PMID: 38192053; PMCID: PMC10901608.
- Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). Historia de domesticación y propagación de *Aedes aegypti*: una revisión. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(suppl 1), 11-17.
- Routhu, N. K., & Byraredy, S. N. (2017). Interacción Viral del Virus Zika en la Modulación de la Patogénesis de la Enfermedad. *J Pharmacol Neuroimmune*, 122, 219–232. doi: 10.1007/s13311-017-0561-1

- Rubin, E. J., Greene, M. F., & Baden, L. R. (2016). Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med*, 374(10), 984–985.
- Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, et al. 2018. El mapeo comparativo de la interacción de proteínas flavivirus-hosped revela los mecanismos del dengue y la patogénesis del virus del Zika. *Cell*175(7):1931-45
- S. Ospina-Prieto, W. Chaiwangyen, J. Herrmann et al. Investigación traslacional, vol. 172, págs. 61–72, 2016..
- Sirohi D, Kuhn RJ. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis*, 216(suppl 10), S935–S944. doi: 10.1093/infdis/jix515. PMID: 29267925; PMCID: PMC5853281.
- Shiryaev, S. A., Farhy, C., Pinto, A., Huang, C.-T., Simonetti, N., Elkin, I., ... & Strongin, A. Y. (2017). Characterization of the Zika virus two-component NS2B-NS3 protease and structure-assisted identification of allosteric small-molecule antagonists. *Antiviral Research*, 143, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.04.014>.
- Smithburn, K. C. (1952). Anticuerpos neutralizantes contra ciertos virus recientemente aislados en los sueros de seres humanos que residen en África Oriental. *Journal of Immunology*, 69, 223-234.
- Smoots, A. N., Olson, S. M., Cragan, J., Delaney, A., Roth, N. M., Godfred-Cato, S., et al. (2020). Vigilancia Basada en la Población de Defectos de Nacimiento Potencialmente Relacionados con la Infección por el Virus del Zika - 22 Estados y Territorios, enero 2016-junio 2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(3), 67-71. doi: 10.15585/mmwr.mm6903a3
- Tan, T. Y., Fibrianah, G., Kostyuchenko, V. A., et al. (2020). The structure of the capsid protein in the Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun*, 11(1), 895. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Trew Deckard, D., Chung, W. M., Brooks, J. T., Smith, C. J., Woldai, S., Hennessey, M., Kwit, N., & Mead, P. (2016). Transmisión Sexual de Hombre a Hombre del Virus Zika — Texas, enero de 2016.
- Vigilancia y control de vectores | virus Zika | CDC. (2016). Recuperado de <https://www.cdc.gov/zika/vector/index.html>

ANEXOS

A.

Datos de controles plasmidiales		
Clones ZikPan	Clon 1	Clon 2
Gen	NSP5	
Tamaño inserto	175 pb	
Secuencia de Inserto	GATACCTGCAGCCCTATGGAAAGGTCATTGATCTTGGATGTGGCAGAGGGGGCTGGAGTT ACTACGCCGCCACCATCCGCAAAGTTCAAGAAGTGAAAGGATACACAAAAGGAGGCCCTG GTCATGAAGAACCCGTGTTGGTGCAAAGCTATGGGTGGAACATAGTCCGTCCTAA	
Posición en gen	174-348	
Vector de clonning	pGEM®-T Easy Vector Systems https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf?la=en	
Tamaño vector	3016 pb	
Primer de Templado	ZikPan	
Fw ZikPan	5'GATACCTGCAGCCCTATGGA' 3	
Rv ZikPan	5'TTAAGACGGACTATGTTCCA' 3	
Volumen	30-50 uL	
[ng/uL]	484	705.4
Sentido de inserción	Plus/Plus	
Glicerol stock	50 %	
Ubicación	Glicerol Stock: Caja de controles de pruebas, almacenada en compartimiento de Dra. Anayansi Valderrama, Departamento de Investigación en Entomología Médica. Alícuota de plásmido: Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología (congelador de Proyecto Dengue)	
Purificación Plasmidial	Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	
Cepa control utilizada	ZIKV/Homo sapiens/PAN/CDC-259249_V1-V3/2015 (GenBank: KX156775.2)	
Diseño de Primers	Franklyn Samudio	
Construcción in vitro	Brigitte Henríquez	

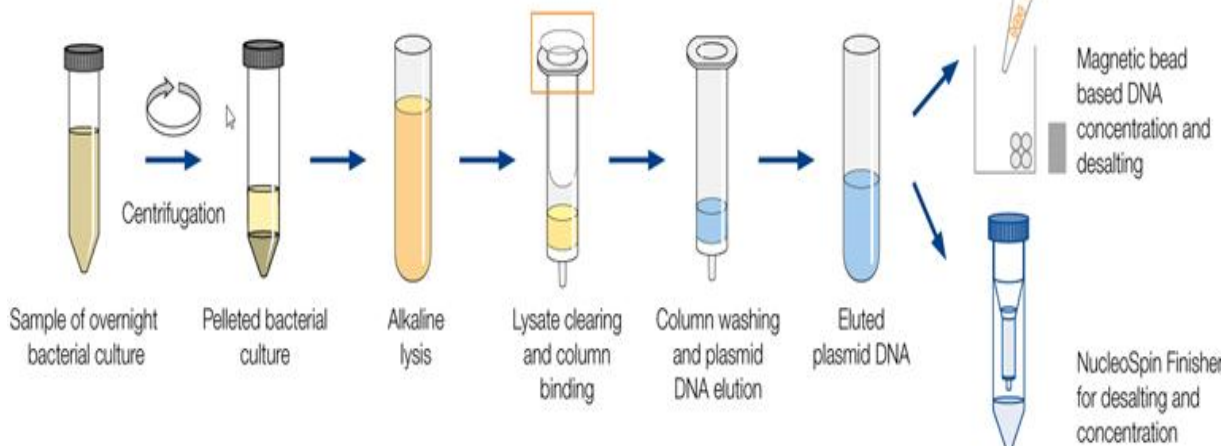
B.



D.



C.



E.

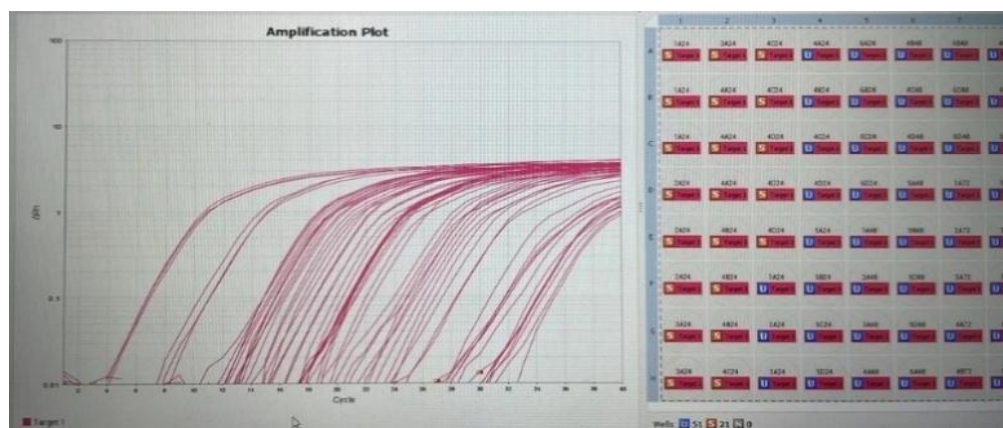


Figura 22. Curvas estándar de la gama de plásmido ZikPan. (A) Referencia de la información del plásmido ZikPan, plásmido y protocolo de RT-PCR desarrollado por (Henriquez. B) (artículo en publicación). (B) kit comercial (Plasmid DNA purification, NucleoBond® Xtra, Macherey-Nagel). (C) procedimiento de extracción. (D) Del Stock del plásmido de 200 μL , se tomó 20 μL y se diluyó en 66.74 μL de H_2O , para que quedará 1×10^7 copias por μL , siendo el valor más concentrado de la gama. (E) Para probar la gama de plásmido se realizó diluciones seriadas de 1×10^7 hasta 1×10^1 . Se hizo una RT-PCR en donde se sirvió cada muestra por triplicado como se muestra en la corrida. Las curvas de menor CT (que aparecen antes) corresponden a las diluciones más concentradas de plásmido.

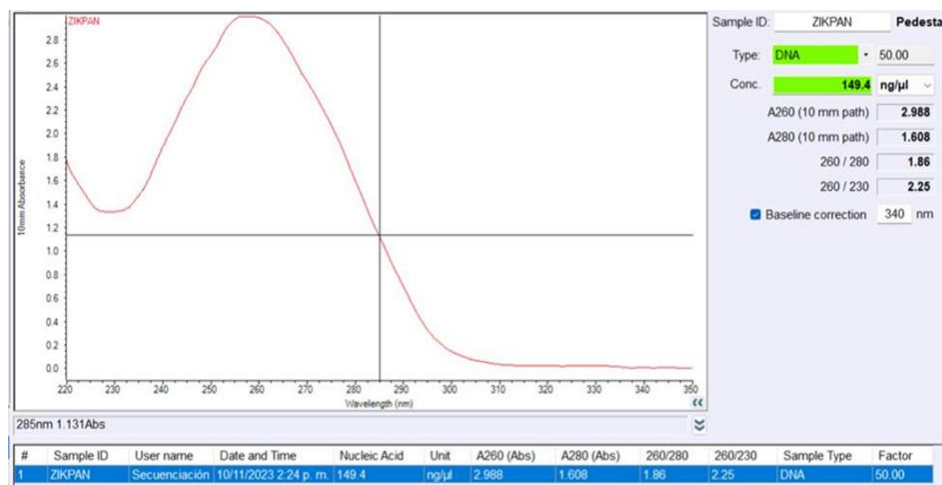


Figura 23. Concentración de ADN (ng/ μL) de plásmido ZikPan. El plásmido que se produjo se diluyó en 200 μL de H_2O y luego se midió su concentración en el Espectrofotómetro de micromuestra Nanodrop™ 2000 (Ref. ND2000 ThermoScientific).

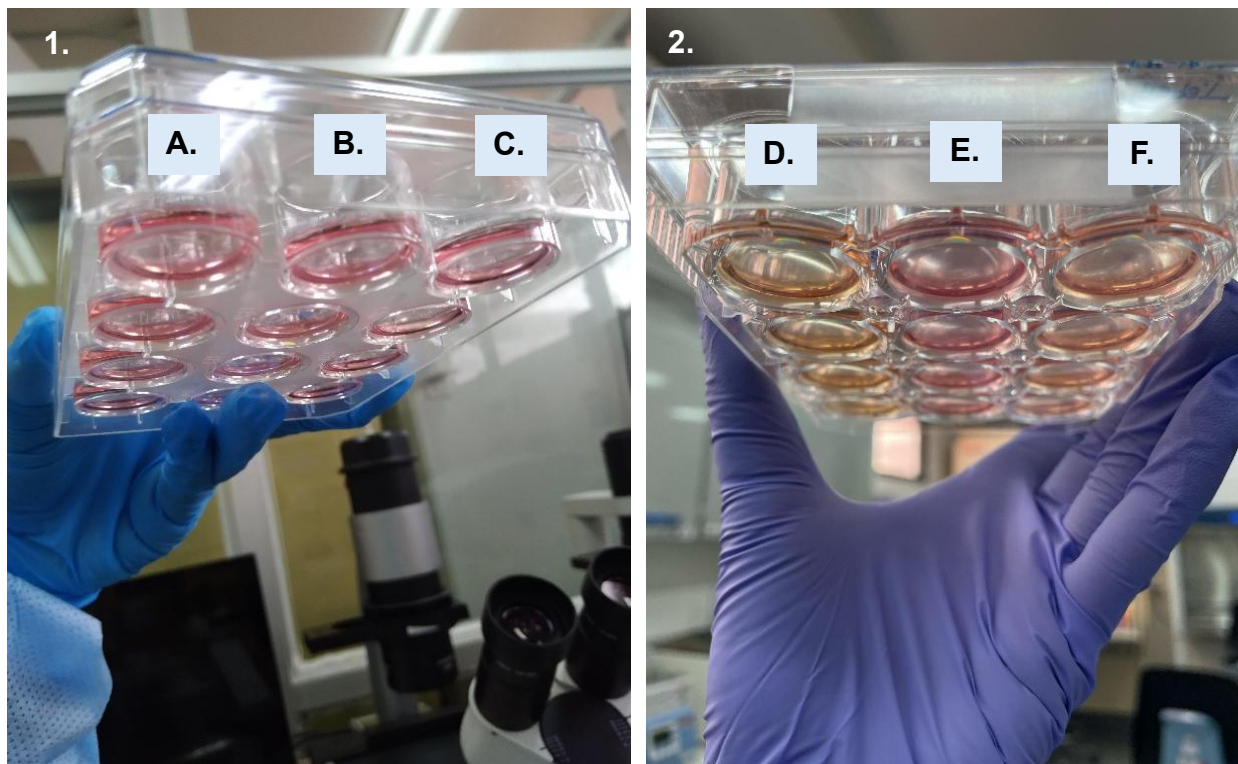


Figura 24. Cultivos de HEK-293T inoculados con ZIKV. (1) Plato de 12 pocillos con células HEK-293T a las 24h de infección con ZIKV. (A, B, C) se observó que el sobrenadante (tratamiento) de los platos con cultivos celulares presentaban un color rojo/rosado a las 24h y permanecían así hasta las 48h, lo cual nos indicaba que el pH del sobrenadante aún permanecía neutro y saludable. (2) Plato con células HEK-293T al día 5 de infección con ZIKV, este presenta unas características de color peculiares en todos los sobrenadantes de cultivo (D) el tratamiento con DMEM y (F) con sobrenadante de HEK-293T cambio a color amarillo brillante/naranja, probablemente esto se debió a un pH más ácido producido por la glucólisis celular. Las células con tratamiento de sobrenadante PDMSC (E) permanecieron con la misma coloración que a las 24h, cabe resaltar que las PDMSC crecen en medio DMEM bajo en glucosa, por este motivo consideramos que metabólicamente las HEK-293T no tenían tanta glucosa para consumir, manteniéndolas dentro de un rango saludable.



Figura 25. Observación y toma de fotos del Efecto citopático de ZIKV.

Para la observación del efecto citopático inducido por ZIKV, (A) sacamos cuidadosamente los plas de cultivos de la incubadora, (B) colocamos en microscopio en el cambo ideal (20x) para observar las células, (C) y tomar datos importantes como: color de sobrenadante, alteraciones morfológicas características de las células producto de la infección viral y porcentaje aproximado de muerte celular, así como los focos de infección visibles.

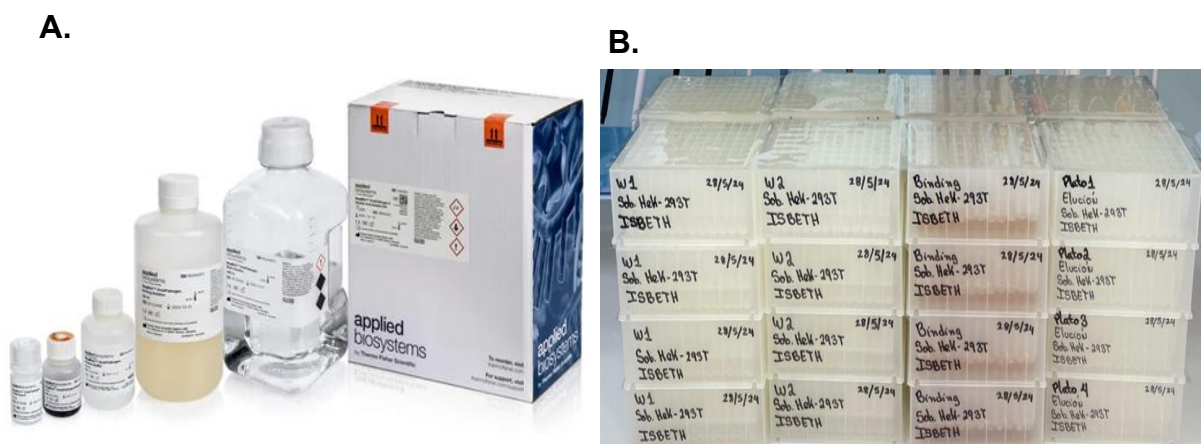


Figura 26. Preparación automatizada de placas de extracción de ARN utilizando el sistema KingFisher Flex. El proceso permite una purificación eficiente y reproducible del ARN mediante perlas magnéticas, optimizando el rendimiento y reduciendo la variabilidad manual. (A) Kit MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation, (B) platos preparados.

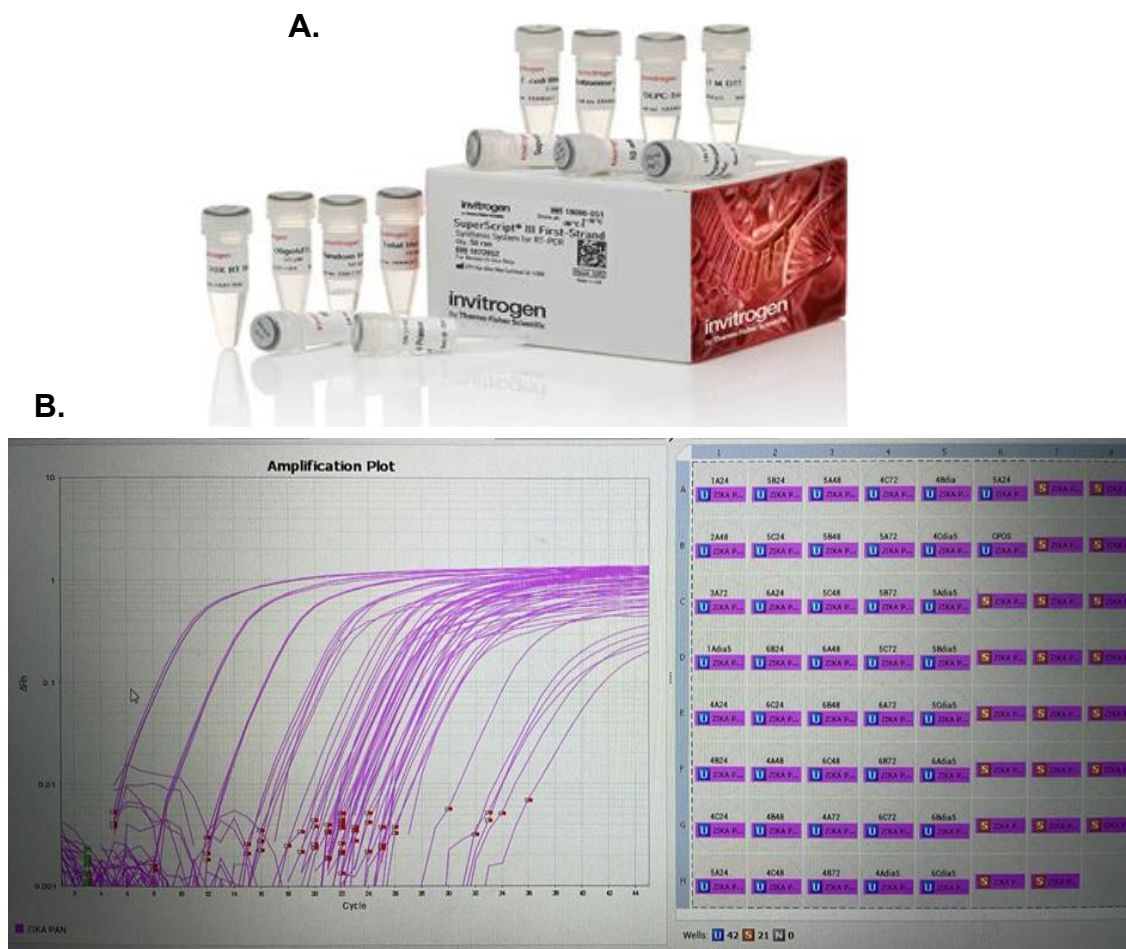


Figura 27. RT-PCR tiempo real

Se realizó una RT-PCR en tiempo real para la detección del ARN de ZIKV a partir de sobrenadantes recolectados de los experimentos y previamente extraídos. (A) kit SuperScrip®IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction para detección del ARN viral de ZIKV. (B) Las muestras de cultivo celular inoculas con ZIKV y analizadas mostraron amplificación positiva en los pocillos correspondientes a la detección del virus, donde pudimos observar curvas de amplificación claras y valores de CT (umbral de ciclo viral) dentro del rango esperado para una infección positiva (generalmente los CT < 35). El control positivo del ensayo amplificó en los valores esperados, mientras que el control negativo (agua libre de nucleasas) no mostró amplificación, confirmando la validez del ensayo. La cuantificación la realizamos gracias al plásmido ZikPan corrido en diluciones por triplicados, como muestras controles adicionales.

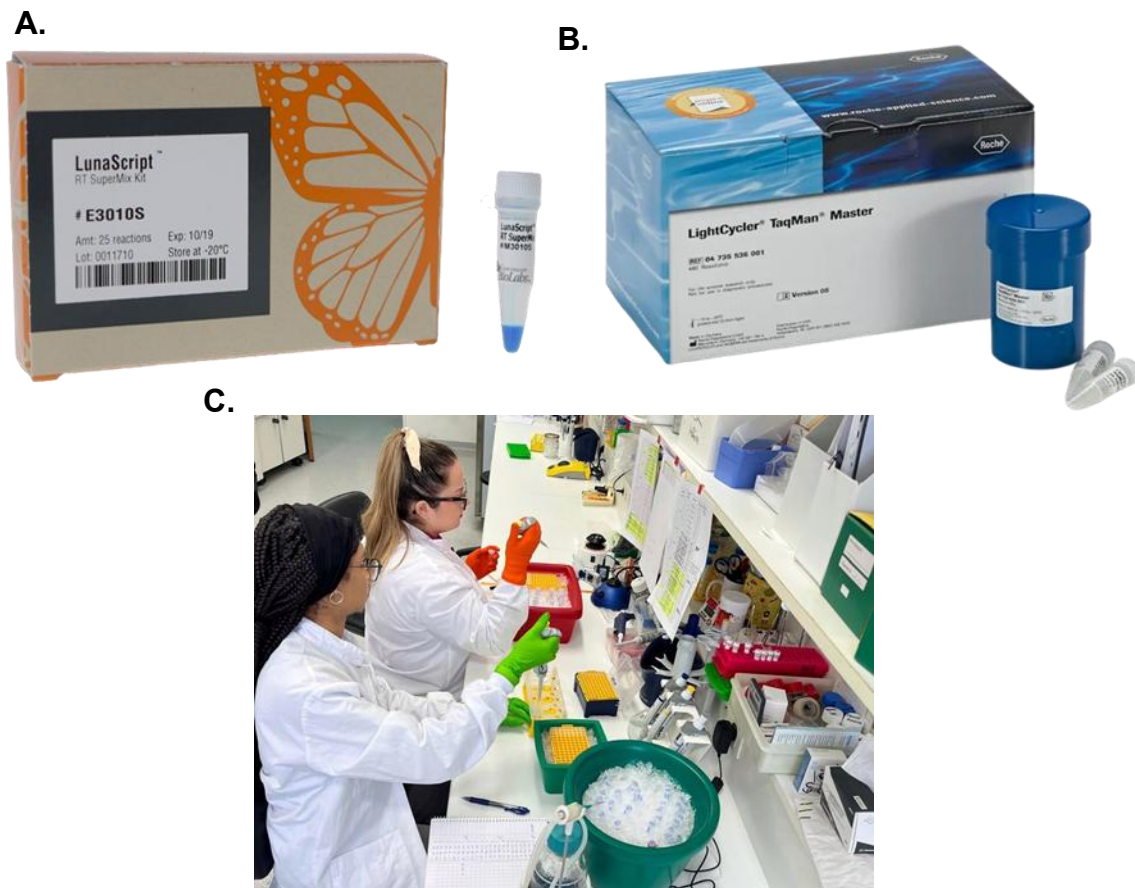


Figura 28. RT-qPCR en tiempo real para Intrón 7 del C19MC (Francia, Inserm- Infinity)
 Para la síntesis de cADN se utilizó el (A) kit comercial LunaScript™ RT SuperMix, y
 para la RT-qPCR el (B) kit ROCHE Lightcycler 480 SYBR green, (C) procedimiento de
 en hielo, para mantener las muestras.