

**EL AISLADO COLOMBIANO ZIKV COL345Si ESTABLECE INFECCIÓN  
PERSISTENTE EN LAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA  
MEDIANTE LA REGULACIÓN DE GENES ASOCIADOS CON AUTOFAGIA,  
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INTERFERÓN E INFLAMATORIA.**

**YANETH DE JESUS MIRANDA BRAND, M.Sc**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Doctora en  
Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Virología**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
MEDELLÍN-COLOMBIA  
2023**

**EL AISLADO COLOMBIANO ZIKV COL345Si ESTABLECE INFECCIÓN  
PERSISTENTE EN LAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA  
MEDIANTE LA REGULACIÓN DE GENES ASOCIADOS CON AUTOFAGIA,  
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INTERFERÓN E INFLAMATORIA.**

**YANETH DE JESÚS MIRANDA BRAND, M. Sc**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Doctora en  
Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Virología**

**Tutor:**

**Liliana Betancur Galvis, Ph.D.**

**Co-tutor:**

**Astrid Bedoya, M. Sc, Ph.D.**

**Comité Tutorial:**

**Juan Carlos Gallego Gómez, B. Sc, Ph.D.**

**Jhon Carlos Castaño, MD, M. Sc, Ph.D.**

**María Isabel Giraldo, M. Sc, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
MEDELLÍN-COLOMBIA**

**2023**

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por ser mi guía espiritual y a mis padres, Gladys Brand Núñez y Tomás Mirada Marrugo, a mi hermano Juan José Miranda Brand porque fueron un soporte emocional, importante, en todo el proceso; gracias por tanto amor y por sus cuidados cuando intenté desfallecer.

Un agradecimiento a mis amigos que me acompañaron en todo momento, a quienes quiero profundamente y he acogido como mi familia, en especial a Vicky Roa, Grace Carreño, Paula Pérez, Karen Robles, Janeth Bedoya y Juan Felipe Valdés.

Gracias al proyecto Colciencias-744/2016 proyecto 111574455595 “*Moléculas sintéticas con potencial anti-dengue como una alternativa para el control de la infección in vitro por virus zika*”, por vincularme como estudiante y ser un actor durante el inicio de mi formación como estudiante de doctorado. Adicionalmente, gracias al Grupo de Medicina Molecular de Translación (GMMT) y a su proyecto de Minciencias “*DENGUE: Disfunción Endotelial- Nuevo Giro que Urge en el Enfoque fisiopatológico para entender la enfermedad 51-1-884*” por apoyarme con su infraestructura para el desarrollo de la investigación, a su director por los aportes científicos y a mis compañeros del GMMT.

Además, doy gracias a los miembros del comité tutorial por sus contribuciones en cada reunión semestral; especialmente a María Isabel Giraldo.

Por otra parte, agradezco a la Corporación Ciencias básicas Biomédicas y en especial, a su directora Eliana Restrepo Pineda por su asistencia administrativa y humana durante mi proceso formativo y a mis compañeros del posgrado, de quienes me nutrí ostensiblemente durante mi rol de representante estudiantil, gracias por tanto compañerismo y por mostrarme que, en esta nueva generación de científicos las cooperaciones y benevolencia, tienen un lugar; ese el camino para construir ciencia.

Mi gratitud al Instituto Nacional de Salud (Grupo de Genómica de microorganismos emergentes) por el soporte técnico-científico en la fase final del trabajo de grado, en especial a Diego Álvarez y también, al grupo de Neurociencias - UdeA, a mis compañeros y a las amistades que establecí en ese lugar.

Finalmente, gracias a Minciencias y a la Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50 y a todos los docentes, investigadores y compañeros que me apoyaron.

## Tabla de contenido

<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	7
<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1.1 ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1 Género Flavivirus: generalidades</b> .....	17
<b>2.2 Patogénesis del ZIKV</b> .....	19
2.2.1 Transmisión ZIKV.....	19
2.2.2 Tropismo viral .....	19
<b>2.2.3 Infecciones por ZIKV en sistema reproductor masculino</b> .....	20
2.2.3.1 La glándula prostática: importancia para el sistema reproductor masculino y blanco de agentes infecciosos .....	21
<b>2.2.4 Determinantes de virulencia</b> .....	23
2.2.4.1 Clasificación filogenética del ZIKV: Linajes determinantes de virulencia.....	23
2.2.4.2 Genes virales implicados en virulencia .....	23
<b>2.2.5 Interacción virus-célula: posible relación durante la infección persistente de los virus RNA</b> .....	24
2.2.5.1 Inmunidad innata de virus RNA: flavivirus .....	25
2.2.5.2 Estrategia de evasión del sistema inmune por los flavivirus: ZIKV .....	26
2.2.5.3 Activación de vía de supervivencia celular durante la infección por flavivirus.....	30
2.2.5.4 Diseminación célula a célula de los flavivirus .....	31
2.2.5.5 Otras interacciones virus-célula: Autofagia, estrés de retículo y oxidativo .....	32
<b>2.2.6 Manifestaciones clínicas de la infección por ZIKV</b> .....	35
2.2.6.1 Síndrome congénito del ZIKV (CSZ) .....	35
2.2.6.2 Síndrome de Guillain-Barré (SGB) .....	36
2.2.6.3 Manifestaciones en el sistema reproductor masculino: prostatitis .....	36
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	37

<b>4. OBJETIVOS</b> .....	38
4.1 Objetivo general .....	38
4.2 Objetivos específicos.....	38
<b>5. HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	39
5.1 Hipótesis nula .....	39
5.2 Hipótesis alternativa .....	39
5.3 Pregunta de investigación .....	39
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
6.1 Líneas celulares y virus .....	38
<b>6.2 Infección del ZIKV (COL345Si) en las células PC3</b> .....	40
6.2.1 Caracterización del aislamiento colombiano del virus Zika COL345Si (MH179341.1) .....	40
6.2.2 Detección de los receptores AXL y TIM-1 .....	40
<b>6.2.3 Replicación del virus zika en células PC3</b> .....	41
6.2.3.1 Curva de crecimiento viral .....	41
6.2.3.2 Cuantificación de RNA viral .....	41
6.2.3.3 Viabilidad celular .....	42
6.2.3.4 Evaluación de la respuesta antiviral en células PC3.....	42
<b>6.3 Evaluación de la infección persistente del ZIKV (COL345Si) en las células PC3</b> ..	43
6.3.1 Genómica comparativa de los virus secuenciados .....	44
6.3.2 Transcriptómica de la infección persistente en células PC3 y análisis bioinformático .....	44
<b>6.3.3 Hallazgos fenotípicos del cultivo persistente</b> .....	45
6.3.3.1 Detección de receptores AXL y TIM-1 .....	45
6.3.3.2 Detección de mRNA del receptor de andrógeno y la proteína citoqueratina 18 (CK- 18) .....	45
6.3.3.3 Evaluación de la expresión de la CK18 .....	46
6.3.3.4 Evaluación de respuesta inflamatoria durante la infección persistente	
6.3.3.5 Análisis estadísticos .....	47
<b>7. RESULTADOS</b> .....	47
<b>7.1 Caracterización de la infección del ZIKV (COL345Si) en las células PC3</b> .....	47

7.1.1 El aislado colombiano del virus Zika COL345Si (MH179341.1) tiene características similares al linaje asiático-americano.....	47
7.1.2 Las células de adenocarcinoma de próstata (PC3) expresan los receptores AXL y TIM-1 .....	48
7.1.3 El aislado colombiano de ZIKV se replica en las células PC3.....	50
7.1.4 ZIKV modula la respuesta antiviral en las células PC3 .....	52
<b>7.2 Evaluación de la infección persistente del ZIKV (COL345Si) en las células PC3..</b>	<b>53</b>
7.2.1 ZIKV establece infección persistente en la línea celular PC3.....	53
7.2.2 El virus ZIKV realiza cambios en su genoma durante la infección persistente .....	54-55
7.2.3 La infección persistente del ZIKV regula la vía de autofagia y la respuesta a interferón .....	55
<b>7.3. Hallazgos fenotípicos del cultivo persistente .....</b>	<b>59</b>
7.3.1 El cultivo persistente expresa los receptores AXL y TIM-1 y presenta alteraciones en los niveles transcripcionales y proteicos de CK-18 .....	60
7.3.2 El ZIKV disminuye la respuesta inflamatoria durante la infección persistente .....	61
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
8.1 El aislado colombiano del virus Zika (COL345Si) se replica en las células PC3 y modula la respuesta antiviral .....	65
8.2 El aislado colombiano del virus Zika (COL345Si) establece infección persistente en las células PC3 obteniendo cambios en sus proteínas estructurales (PrM y E) y no estructurales (NS1) y regulando la expresión transcripcional de genes relacionados a la autofagia y respuesta a interferón. ....	69
8.3 La infección persistente del ZIKV COL345Si causa cambios en la expresión de CK-18 y del receptor AXL .....	73
8.4 La persistencia de ZIKV en las células PC3 modula la respuesta inflamatoria .....	75
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>10.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>77</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
<b>12. GRADO DE ORIGINALIDAD .....</b>	<b>93</b>
<b>13. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....</b>	<b>94</b>

## INDICE DE TABLAS, IMAGENES Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Antecedente: infección del virus ZIKV en las células PC3 .....	16
<b>Imagen 1.</b> Ciclo de replicación de los flavivirus .....	18
<b>Imagen 2.</b> Blancos de replicación del ZIKV en SRM .....	21
<b>Imagen 3.</b> Tejidos asociados con persistencia viral.....	25
<b>Imagen 4.</b> Activación de la respuesta antiviral (IFN-I/III) a través de los PRRs. ....	26
<b>Imagen 5.</b> Vía de señalización de los receptores TAM-IFNR.....	27
<b>Imagen 6.</b> Estrategia de evasión inmune de virus Zika .....	29
<b>Tabla 1.</b> Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por el ZIKV.....	30
<b>Imagen 7.</b> Tipos de autofagia .....	34
<b>Tabla 2.</b> <i>Primers</i> empleados para la amplificación del interferón- $\beta$ y genes antivirales.....	43
<b>Tabla 3.</b> <i>Primers</i> utilizados para cuantificar el receptor de andrógeno y CK-18 .....	46
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético de varias cepas del virus zika y dengue en comparación con el aislado COL354Si .....	48
<b>Figura 3.</b> Las células PC3 y Vero E6 expresan receptores celulares AXL y TIM-1.....	49
<b>Figura 4.</b> Expresión de los receptores AXL y TIM-1 en PC3 (a) y Vero E6 (b) .....	50
<b>Figura 5.</b> Dinámica de replicación de ZIKV en células PC3 .....	51
<b>Figura 6.</b> Respuesta inmune innata frente al virus del Zika en células PC3 .....	52
<b>Figura 7.</b> El aislado colombiano de ZIKV Zika establece infección persistente en las PC3 .. .....	53
<b>Tabla 4.</b> Mutaciones virales identificadas durante la persistencia de ZIKV del aislado colombiano ZIKV COL345Si .....	55
<b>Figura 8.</b> infección persistente del ZIKV regula dinámicamente la autofagia.....	56
<b>Figura 9.</b> infección persistente del ZIKV modula la respuesta antiviral en los diferentes tiempos de la infección.....	57
<b>Figura 10.</b> Los receptores AXL y TIM-1 permanecen expresados durante la infección persistente en las células PC3 .....	58
<b>Figura 11.</b> La infección persistente por virus zika disminuye la expresión génica de la citoqueratina 18 .....	59
<b>Figura 12.</b> La infección persistente por virus zika disminuye la expresión de la citoqueratina 18 (CK-18) .....	60

<b>Figura 13.</b> La infección persistente por virus zika, disminuye la respuesta inflamatoria en células PC3 .....	63
<b>Figura 14.</b> Correlación entre las IL-6, IL-1 $\beta$ e IL-8 con la persistencia viral .....	64
<b>Figura S1.</b> Condiciones de mantenimiento celular para el cultivo persistente .....	94
<b>Figura S2.</b> Identificación de las mutaciones del aislado colombiano de ZIKV .....	94
<b>Figure S3.</b> Detección de los receptores AXL y TIM-1 por <i>In-Cell Western</i> en células PC3 .....	95
<b>Figura S4.</b> Permisividad del ZIKV en las células PC3 y VERO E6 .....	96
<b>Figure S5.</b> Efecto citopático de las líneas celulares Vero E6 y PC3 durante la infección por ZIKV .....	97
<b>Figure S6.</b> Hallazgos de la infección con los diferentes serotipos de DENV y ZIKV/Dakar .....	98
<b>Figura S7.</b> Cinética viral de flavivirus en las células PC3 durante 8 s.p.i. ....	99
<b>Figura S8.</b> Procesos Biológicos regulados durante la infección persistente de ZIKV en las células PC3 .....	99
<b>Figura S9.</b> Regulación transcripcional de estrés de retículo durante la infección persistente .....	100
<b>Figura S10.</b> Dinámica transcripcional de los receptores TIM-1 y AXL durante la persistencia de ZIKV en las células PC3 .....	100



## ABREVIATURAS

AXL: *Receptor tyrosine kinase*

CHIKV: virus del Chikunguña

CK-18: citoqueratina 18

CPE: efecto citopático

CSZ: Síndrome congénito del ZIKV

CXCL: Quimiocinas

DENV: virus dengue

dsRNA: *double stranded RNA*, intermediarios replicativos

E: proteína de envoltura

EBOV: virus del ébola

ER: retículo endoplasmático

ERAD: Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD)

FBS: Suero fetal bovino

HBV: virus de la hepatitis

HCV: virus de la hepatitis C

HIV: virus de inmunodeficiencia humana

HSV: Virus Herpes simplex

*IFITM-1: Interferon-induced transmembrane protein 1*

IFN: interferón

IFNAR: Receptor del interferón

IL: interleuquinas

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

ISGs: genes antivirales inducidos por interferón

JEV: virus de la encefalitis japonesa

*Mock*: células no infectadas

MOI: Índice de Multiciplidad de infección

NLRs: *Nod-like receptors*

NS1: proteína no estructural 1

OAS-1: oligoadelinato sintetasa -1

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

PKR: *protein Kinase R*  
PrM: proteína de premembrana  
RLR: *RIG-Like Receptors* (RIG-I y MDA5)  
RWPE-1 : Células de próstata no tumorales  
SGB : Síndrome de Guillain-Barré  
SOCS-1 : *suppressor of cytokine signaling*  
TIM-1 : *T cell immunoglobulin mucin domain-1*  
TLRs (1- 9): *Toll-like receptors*  
UPR: *unfolded protein response*  
USP18: *Ubiquitin specific peptidase 18*  
WNV: Virus del oeste del Nilo  
ZIKV COL345Si: Zika cepa colombiana  
ZIKV/PRVABC59: Zika cepa Puerto Rico  
ZIKV: virus zika

## RESUMEN

El virus Zika (ZIKV), es un flavivirus que es transmitido principalmente por *A. aegypti* y *A. albopictus*. No obstante, la transmisión sexual también ha sido documentada y descrita. La detección del RNA del ZIKV en el semen de hombres vasectomizados constituyen un indicio de que las glándulas accesorias (como la próstata), eventualmente, son nichos de replicación viral. En este estudio, se caracterizó la infección de ZIKV en células de adenocarcinoma de próstata (PC3), se demostró la expresión de AXL y TIM-1 y se evaluó el perfil antiviral. Los resultados mostraron que, las células PC3 son susceptibles y permisivas a la infección por ZIKV sin alterar la viabilidad celular, ni provocar un efecto citopático (CPE). El perfil antiviral sugiere que las células PC3 modulan la respuesta antiviral a través de la expresión de la molécula supresora, SOCS-1, hasta las 120 horas post-infección (h.p.i.), es decir, en un periodo de infección temprana. Lo anterior, suscitó a estudiar la persistencia del ZIKV en células de próstata hasta 8 semanas post-infección (s.p.i) y definir los componentes virales/celulares comprometidos en esta. El hallazgo de viriones, genoma viral, dsRNA y proteína de envoltura viral prueban la presencia de infección a las 8 s.p.i., por lo cual, se demuestra la persistencia de ZIKV en las células PC3. El perfil transcripcional analizado sugiere que dicha persistencia se debe a la modulación transcripcional de procesos celulares como autofagia, respuesta inmune innata e inflamación. La infección prolongada, produjo cambios en la expresión de la citoqueratina 18 (CK-18), una proteína importante para la función secretora del epitelio prostático y, además, se observó una modulación en la respuesta inflamatoria durante el ciclo de infección, así lo constató las fluctuaciones en la secreción de la IL-6. Considerando que, algunos genes de autofagia (principalmente aquellos que participan en la formación del autofagosoma) incrementan su expresión en los tiempos donde hay mayor rendimiento viral, se puede inferir que este proceso es importante para potenciar la replicación viral y posiblemente module la respuesta inmune innata y el ambiente inflamatorio; favoreciendo así, la persistencia del ZIKV.

## ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus transmitted mainly by *A. aegypti* and *A. albopictus*; however, sexual transmission has also been documented and described. The detection of ZIKV RNA in the semen of vasectomized men is an indication that the accessory glands (such as the prostate), eventually, are niches of viral replication. In this study, the ZIKV infection in prostate adenocarcinoma (PC3) cells was characterized, AXL and TIM-1 expression were demonstrated, and the antiviral profile was evaluated. The results showed that PC3 cells are susceptible and permissive to ZIKV infection without altering cell viability or causing a cytopathic effect. The antiviral profile suggests that PC3 cells modulate the antiviral response through the expression of the suppressor molecule, SOCS-1, up to 120 h.p.i., ie, during early infection. Here, we studied the viral and cellular components involved in ZIKV persistence in prostatic cells up to 8 weeks post-infection (w.p.i). We observed the presence of infectious virions, viral genome, dsRNA, and viral envelope protein at 8 w.p.i, suggesting that the persistence of ZIKV in PC3 cells can be generated by the modulation of transcriptional factors involved in autophagy, innate immune response, and inflammation. Additionally, a persistent infection generated changes in the expression of cytokeratin 18 (CK-18), an important protein for the prostatic epithelium's secretory function. Also, it was demonstrated a modulation in the inflammatory response during the infection cycle, by the presence of fluctuations in IL-6 secretion. Considering that some autophagy genes (mainly those that are involved in autophagosome formation) are upregulated at times when is a higher viral yield, it could be inferred that this process is important to enhance viral replication and possibly modulates the innate immune response and the inflammatory environment; thus, benefit to the persistence of ZIKV infection.

## 1. INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZIKV) es un flavivirus transmitido por los vectores *Aedes aegypti* y *A. albopictus* (1). Sin embargo, los hallazgos clínicos indican que también se transmite por vía sexual (2). Aunque ZIKV se ha detectado en diferentes fluidos corporales (saliva, sangre y orina) (3), el virus persiste por un tiempo prolongado en el semen; así lo ha mostrado la presencia del RNA viral y partículas infecciosas hasta los 69 y 304 días post-infección (d.p.i), respectivamente (4). Por lo tanto, el sistema reproductor masculino (SRM) es, potencialmente, un reservorio viral debido a que los testículos son sitios inmunoprivilegiados, y esto le confiere al virus una ventaja para que pueda replicarse durante un largo periodo (4). En pacientes vasectomizados se ha verificado la infección por ZIKV mediante la detección de RNA (77 -96 dpi) y el aislamiento del virión (69 dpi) (4). Adicionalmente, se ha encontrado que, el RNA del ZIKV perdura en diferentes tejidos del sistema reproductor de ratones C57BL/6J (próstata) (5) y primates (testículos, nódulos linfáticos genitales y próstata) (5,6) a los 21 y 42 dpi, respectivamente (6).

Las enfermedades prostáticas están relacionadas con alteraciones de la fertilidad (7) debido a que la próstata es una glándula que suministra al contenido seminal diversos nutrientes como: el  $Zn^{2+}$ , citrato y caliceínas, entre otros, que contribuyen a la calidad del semen y, por ende, a la viabilidad de los espermatozoides (7). Se ha descrito que, para el funcionamiento de la glándula es importante la presencia de un grupo de moléculas denominadas citoqueratinas que conservan la estructura de la próstata (8), estas se ubican de manera diferencial a través de la anatomía prostática. Por ejemplo, la citoqueratina 18 (CK-18) se expresa en epitelio donde se ejerce la actividad secretora (8); por tanto, factores externos que incidan en la arquitectura de este órgano, afectarán en gran manera su funcionalidad. La inflamación crónica- a causa de agentes infecciosos- puede ocasionar una distribución anormal del tejido prostático lo que desencadena disfuncionalidad (9), alteración en la fertilidad y en algunos casos, neoplasia (10).

La presencia de receptores de la familia TAM (Tyro3, AXL y Mer) (3) y TIM-1 (3) en la glándula prostática (10) -pueden ser- determinantes para infección por ZIKV e indican el tropismo del ZIKV hacia este órgano; esto explica el aislamiento de viriones en pacientes vasectomizados y la detección de RNA viral en el tejido prostático de ratones y monos.

El receptor AXL, además de conceder susceptibilidad a la infección, estimula moléculas inmunosupresoras que regulan negativamente el efecto antiviral (13). En células de Sertoli infectadas con ZIKV (14), el factor de transcripción STAT1, una molécula importante en la vía de señalización AXL-IFNAR; se activa promoviendo la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 1 (SOCS-1) que restringe la respuesta del interferón (14). Durante la infección de dichas células, la inhibición de AXL causa: (i) la inactivación de STAT1, (ii) la reducción de SOCS-1 y, por ende, (iii) se incrementa la expresión de genes antivirales inducidos por interferón (ISGs) que disminuyen la replicación viral (14).

La inmunidad innata está conformada por diferentes componentes que cooperan para limitar la infección de diferentes agentes, dentro de estos elementos se encuentra: los interferones tipo I (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ), interferón tipo II (IFN- $\gamma$ ) e interferones tipo III (IFN  $\lambda$ 1–4). Sin embargo, se conoce que los flavivirus (FVs) inhiben la respuesta del interferón gracias a ciertas proteínas virales (11,12).

Al igual que otros FVs, el ZIKV tiene estrategias de evasión inmune que podrían ser crucial para la persistencia viral en la glándula prostática. Por lo tanto, es importante comprender la biología de la infección del ZIKV en células de próstata que abarca varios componentes tales como: el análisis del genoma del virus, dinámica de replicación viral, la respuesta inmune innata, establecimiento de infección persistente, factores virales/celulares asociados a persistencia y consecuencias celulares, en el marco de una infección prolongada.

Debido al difícil mantenimiento de cultivos celulares primarios para la evaluación de la infección del ZIKV en la glándula prostática, se emplearon células epiteliales de adenocarcinoma de próstata (PC3), una línea celular con la vía funcional de la respuesta del interferón (15).

Para investigar la susceptibilidad y permisividad de la infección por ZIKV, se llevó a cabo la detección de los receptores, AXL y TIM-1, el *fitness* viral fue evaluado por varias metodologías y los mRNAs de genes antivirales fueron cuantificados por RT-qPCR. Sucesivamente, se determinó la persistencia viral evidenciando la presencia de elementos virales en células PC3 infectadas con ZIKV hasta las 8 s.p.i. Además, se caracterizó algunos cambios en el genoma del virus en puntos claves de la dinámica de infección, así como la expresión de genes celulares que- probablemente- están vinculados con persistencia.

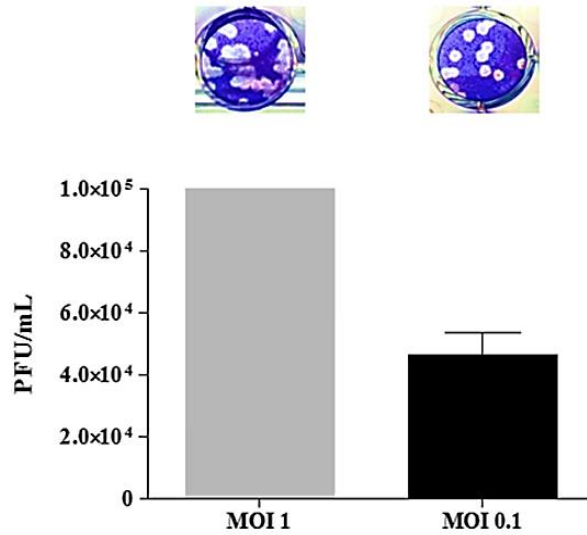
Finalmente, se analizó el impacto de la infección persistente, identificando algunos cambios fenotípicos celulares/consecuencias de dicha infección en las células PC3, específicamente detectando la expresión de una proteína celular del epitelio prostático (CK-18) (8) y marcadores de inflamación (IL-6, IL-8 y e IL- 1 $\beta$ ) (16).

En este trabajo, se demostró que las células PC3 son susceptibles y permisivas a la infección por ZIKV a través del control de la respuesta de interferón por SOCS-1, lo que permite un equilibrio entre la replicación viral y supervivencia de las células PC3 hasta las 120 h.p.i.

Los anteriores resultados, permitieron estandarizar un modelo de infección persistente *in vitro* hasta las 8 s.p.i, cuando se determinó que el ZIKV realiza persistencia en las células PC3 mediante la detección de la proteína de E/dsRNA viral, genomas virales y viriones y, además, se concluyó que durante una infección prolongada se modula: autofagia, respuesta inmune innata e inflamación; posiblemente la IL-6 tiene un papel fundamental en dicha infección. Asimismo, la persistencia viral en las células PC3 puede alterar la expresión de proteínas (CK-18) importantes para la función secretora de la próstata.

## 1.1 ANTECEDENTES

Los síntomas genitourinarios de pacientes infectados con ZIKV y la información disponible en sistemas experimentales *in vivo* e *in vitro* que involucran modelos animales y cultivos de células prostáticas, Sertoli, entre otros, motivan a indagar algunos aspectos de la infección del ZIKV primordialmente, en células de próstata ya que como se mencionó es importante para la fertilidad masculina (4), y las infecciones crónicas en esta glándula han demostrado ser la génesis de otras patologías. Por tal razón, se evaluó la permisividad del ZIKV en la línea celular PC3 dado a que permitía discernir esas interacciones a nivel de respuesta intrínsecas, inmune, etc.; que pueden originarse por la infección de dicho virus. En esta primera aproximación experimental, se observó que el virus tenía una infección productiva en las células PC3 (**Fig.1**) y que no ocasionaba alteraciones metabólicas celulares durante la primera semana de la infección (**dato no mostrado**), esto suscitó a plantear cuáles son las interacciones que ocurrían en este modelo *in vitro* y que estaba promoviendo el balance entre la supervivencia de la célula y la replicación del virus.



**Figura 1.** Antecedente: infección del virus ZIKV en las células PC3. La figura muestra que el virus produce progenie viral a los 7 d.p.i. con las diferentes multiplicidades de infección evaluadas (MOI=0.1 y 1).

En el marco teórico, se abordarán algunos aspectos generales de la infección que quizás estén implicados en la infección del ZIKV en las células PC3 y algunas repercusiones asociadas.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Género Flavivirus: generalidades

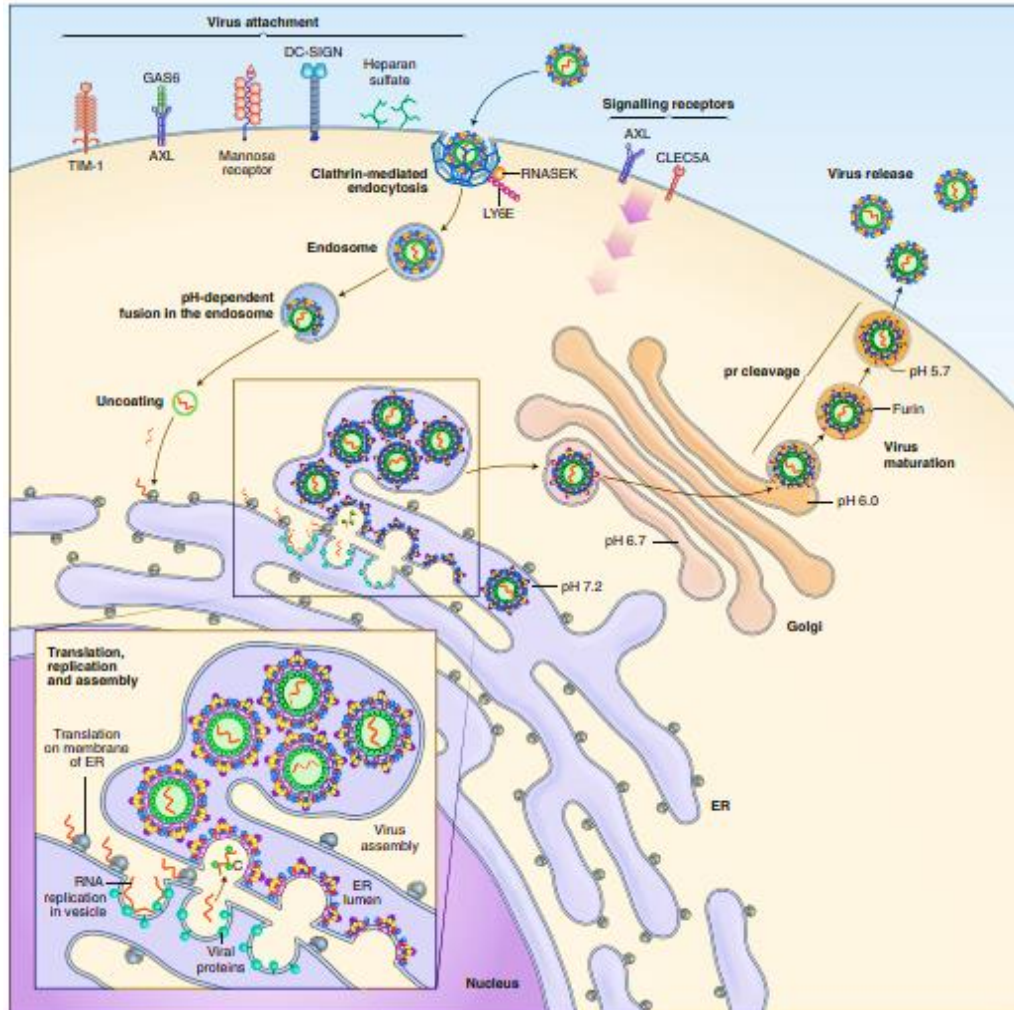
Los flavivirus (FVs) son arbovirus que pertenecen a la familia *Flaviviridae*, se caracterizan por ser virus RNA monocatenario de polaridad positiva y son transmitidos – principalmente- por artrópodos, tales como *A. aegypti*, *A. albopictus*, entre otros (17). Los flavivirus son patógenos humanos que generan impacto en salud pública, dentro de este grupo de agentes infecciosos se destacan: el dengue (DENV1-4), fiebre amarilla (YFV), Virus del oeste del Nilo (WNV) y Zika (ZIKV) (17).

Estructuralmente, son virus de ARN envueltos, con un tamaño de 11 kb, ~50 nm de diámetro, que codifican tres proteínas estructurales: cápside, proteína de membrana y envoltura (C, prM/M y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), siendo estas últimas esenciales para el proceso de replicación y traducción (17).

El ciclo de replicación de los flavivirus, comienza con la unión de la proteína E a los receptores (TIM-1, AXL, DC-SING, receptor de manosa o heparán sulfato) (18), presentes en la membrana celular; posteriormente, se inicia el proceso de endocitosis dependiente o independiente de clatrina (18). Cuando el virus está dentro de los endosomas, la proteína E sufre cambios conformacionales que facilitan la liberación del RNA viral en el citoplasma, donde es transcrito y posteriormente traducido (18) (**Imagen 1**).

La replicación, traducción del RNA viral y morfogénesis del virión ocurren en compartimentos especializados que se originan por cambios conformacionales del sistema de endomembranas (19), a través de la participación de las proteínas no estructurales del virus. Estas estructuras son denominadas complejos replicativos (19) y, además, tienen la función de proteger de los productos de replicación viral de las respuestas inmunitarias de la célula huésped (**Imagen 1**).

La maduración viral inicia en la red *trans*-Golgi donde la prM es separada por proteasas celulares, por una furina celular (20). Por último, los viriones son liberados al espacio extracelular donde el pH neutro produce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere su conformación final, para ser reconocida por los receptores de otra célula susceptible e iniciar un nuevo ciclo de infección (**Imagen 1**).



**Imagen 1.** Ciclo de replicación de los flavivirus. (Tomado de: Pierson and Diamond. Nat Microbiol. 2020)

Los FVs muestran un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde fiebre asintomática o leve hasta enfermedad hemorrágica y complicaciones neurológicas (21). En términos generales, los FVs establecen infecciones agudas que se caracterizan por una rápida producción de viriones seguido por el aclaramiento de la infección y en general, muestran un efecto citopático (CPE); un ejemplo de esto, son las infecciones por DENV en células humanas, de insecto y animales (22, 23). Sin embargo, reportes indican que, otros virus pertenecientes a este género, pueden causar una infección persistente que se definen como: la producción continua o intermitente de viriones, proteínas o genomas virales y particularmente, los virus que constituyen este tipo de infección, no generan CPE en algunos tipos celulares; tal como el ZIKV (6).

En el 2016 las infecciones por ZIKV fueron declaradas emergencia mundial debido a que la infección por ZIKV se ha relacionado con enfermedades neurológicas graves como el síndrome de Guillan-Barré (GBS) (24) y síndrome congénito de Zika. Por lo tanto, en la revisión posterior se abordará algunos aspectos importantes de la infección y patogénesis del ZIKV que permitirán conocer las interacciones virus- célula que potencialmente estén implicadas en la infección persistente.

## **2.2 Patogénesis del ZIKV**

### **2.2.1 Transmisión**

Además de la transmisión vectorial mencionada en el numeral 2.1, ZIKV puede ser transmitido por vía materno-fetal, transfusión sanguínea y transmisión sexual (6); este último mecanismo de propagación, resulta ser diferencial con respecto a otros flavivirus. En el 2011, se reportó el primer caso de transmisión sexual de un americano que contrajo la infección en Senegal y luego contagió a su esposa (25). Las viremias indetectables en suero y el aislamiento del virus en semen, orina y fluido cervical -por un tiempo prologando- después de un periodo de infección aguda (26), sugiere que el virus se replica en ciertos sitios anatómicos que potencialmente son reservorios virales.

### **2.2.2 Tropismo**

Los virus restringen su infección a ciertos tipos de células o tejidos y esta característica, está determinada por la distribución de receptores celulares para la entrada viral (susceptibilidad) (27) o la disponibilidad de genes intracelulares útiles para que el virus establezca su ciclo infeccioso (permissividad) (27).

Particularmente, se ha identificado que, el ZIKV puede infectar células fibroblásticas, queratinocitos, células dendríticas inmaduras, células del sistema nervioso central, espermatozoides, células de Sertoli, las células de Leydig, epitelio vaginal, tejido ocular, etc., a través de los receptores celulares: DC-SIGN, TAM (Tyro3, AXL y Mer) y TIM-1 (3). El amplio tropismo del virus explica la detección del ZIKV en múltiples fluidos corporales, incluido el líquido conjuntival o las lágrimas (ratones y humanos), saliva (primates y humanos), semen (ratones, primates, y humanos), moco cervical (humanos), lavados vaginales (ratones y humanos) y orina (primates y humanos) (3).

### **2.2.3 Infecciones por ZIKV en el sistema reproductor masculino**

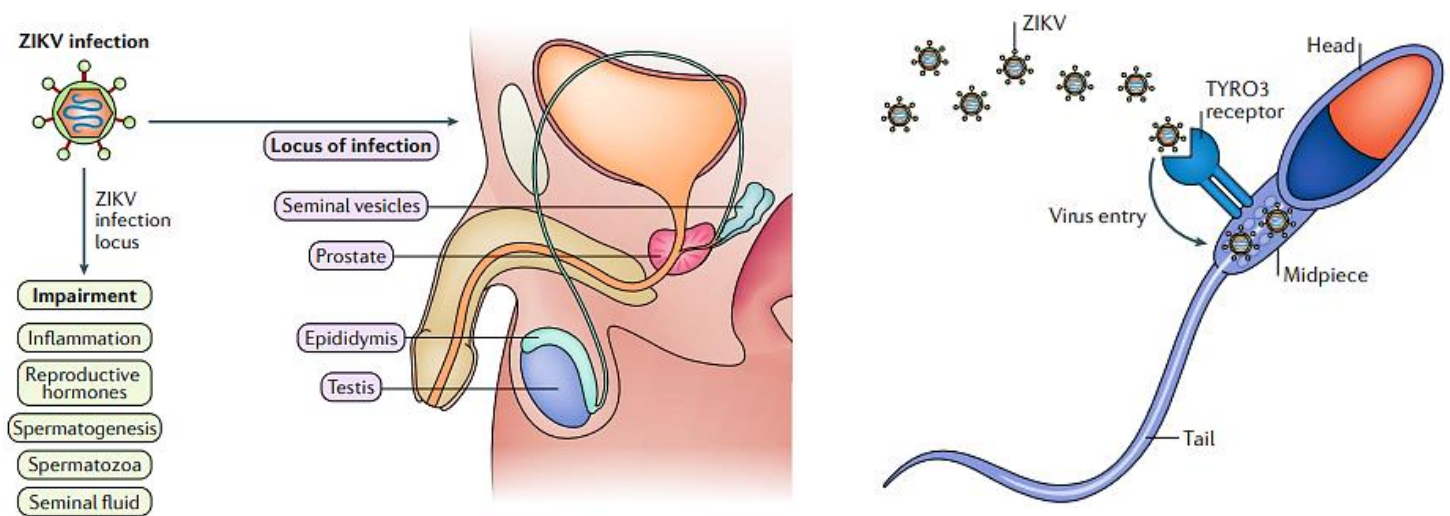
El SRM está conformado por los testículos, el epidídimo, túbulos deferentes, próstata, vesícula seminal, glándulas bulbouretrales y uretra. Cada una de estas estructuras participan en la producción, maduración y protección de los espermatozoides (26) (**Imagen 2**).

Desde que se reportó el primer caso de transmisión sexual por ZIKV en el año 2011, este agente infeccioso ha sido detectado al menos en 14 países no endémicos, cuyos contagios son asociados por el contacto persona a persona (25). Esta vía de diseminación viral es utilizada por ambos linajes del ZIKV (asiático y africano) (25); por lo tanto, esta particularidad del virus aparece antes de su divergencia evolutiva.

El RNA del ZIKV ha sido detectado en el semen de pacientes sintomáticos y asintomáticos hasta 6 meses o 69 días después del periodo de infección aguda (26). Del mismo modo, la adhesión e infección del virus a los espermatozoides (26, 28), ha sido identificada; proponiendo que, además, del semen esta puede ser una vía de transmisión (**Imagen 2**).

La perdurabilidad del virus en semen en comparación con los fluidos vaginales (29) sugiere que, el virus puede tener sitios de replicación localizados en los órganos o células del sistema reproductor masculino.

La persistencia del virus en el SRM, se argumenta por la existencia de un órgano inmunológicamente privilegiado (los testículos) (30) en el cual se protegen las células germinales de efectos perjudiciales que se puede causar por las respuestas inmunitarias. El privilegio inmune es favorecido por diferentes factores; tales como la baja presentación de antigénica de las células dendríticas, disminución de la producción de citoquinas inflamatorias de los macrófagos, secuestro de antígenos y la presencia de la barrera hemato-testicular (30). La disrupción de la respuesta inmune controlada en este sitio anatómico, puede afectar de manera relevante la fertilidad (31).



**Imagen 2.** Blancos de replicación del ZIKV en SRM. (Tomado de: Kurscheidt, Mesquita y col. Nat Review Urology. 2019).

### 2.2.3.1 La glándula prostática: importancia para el sistema reproductor masculino y blanco de agentes infecciosos

La próstata es una glándula accesoria importante para el SRM y está constituida por dos compartimentos principales, el estroma y el epitelial. El estroma, está conformado por células basales que proporciona señales que contribuyen a la regeneración y homeostasis de la próstata (7). Por su parte, el epitelial, está ubicada en la parte luminal y tiene la función de secretar el fluido prostático que contienen factores y proteínas que participan en la activación de los espermatozoides; entre ellos se encuentran las calicreínas (KLK), zinc ( $Zn^{+2}$ ) y citrato (7).

La estructura y funcionamiento de la próstata dependen de la expresión de unas proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios que se conocen como citoqueratinas (CKs). En el tejido prostático normal, las CKs tienen funciones de mantenimiento de la integridad de la estructura celular, transducción de señales y diferenciación en las células epiteliales basales y lumbales. Adicionalmente, forman una barrera rígida la cual evita la entrada de microorganismos. En la próstata se identifican diferentes CKs en los compartimentos mencionados. Por ejemplo: las CK 8 - 18 se co-expresan en el compartimento epitelial/luminal y las CK5- 14 se detectan en el estroma o células basales (7, 8).

Las principales causas de patogénesis en la glándula prostática se constituyen en: hiperplasia prostática benigna, la prostatitis y el cáncer de próstata (9). En cada una de ellas, la respuesta inflamatoria se ha visto implicada. Existen tres condiciones que puede ocasionar un estado inflamatorio, tales como una infección, respuesta autoinmune, un estímulo neurogénico u otro desencadenante (9). Considerando que, esta glándula ejerce funciones esenciales para la fertilidad masculina, una condición de inflamación local puede alterar dicha fertilidad, ya sea por la afectación en la calidad del espermatozoide o, indirectamente, provocando una disfunción prostática (7).

Las prostatitis producidas por agentes infecciosos se clasifican en agudas (ABP) y crónicas y son -principalmente- de origen bacteriano. Microorganismos como *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, son agentes etiológicos de ABP. Del mismo modo, existen otros que establecen infecciones persistentes en la próstata como: *E. coli*, *Proteus spp.*, *C. trachomatis*, *Staphylococcus aureus*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *N. gonorrhoeae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosa*, etcétera (32).

De la misma manera, virus y hongos también han sido reconocidos como causantes de prostatitis, entre ellos se identifican: Citomegalovirus, el virus del papiloma humano (VPH), *Cryptococcus spp.* y *Candida spp.* (32).

En el marco de la epidemia del ZIKV, este fue identificado como un agente viral que tiene tropismo hacia la glándula prostática y una de las evidencias que lo argumenta, es el hallazgo del RNA viral en el semen de pacientes vasectomizados en diferentes días después de un periodo de infección aguda (96, 77, 69 d.p.i) (4). Otro descubrimiento que señala a la próstata como un blanco de infección por ZIKV es la presencia del RNA viral en el tejido prostático de primates y ratones a los 42 y 21 d.p.i (5), de manera respectiva. En el reporte de ratones infectados, se demostró un daño en el tejido a través de la infiltración de células inflamatorias (como los mononucleares) y la disminución de la expresión de una proteína de unión intercelular, la E-cadherina y de la CK 8-18 (5).

Cabe resaltar que, a diferencia de los testículos, la próstata no es un órgano con privilegio inmune (32). Por lo tanto, es determinante conocer la interacción virus-célula que se establece durante la infección persistente del ZIKV e identificar las consecuencias que se genera en

este tipo de infección; toda vez que, se ha observado una relación entre el génesis del cáncer de próstata y las infecciones microbianas crónicas debido a la sostenibilidad de un ambiente inflamatorio en el transcurso de la infección.

#### **2.2.4. Determinantes de virulencia**

La virulencia es definida como la capacidad que tiene un virus para causar enfermedad, es decir, un virus más virulento puede infectar más hospederos y causar manifestaciones clínicas severas que uno menos virulento (27). Esta propiedad, puede ser medida de diferentes maneras: muerte, inducción de tumores o causa de falla orgánica (27). A continuación, se mencionarán algunos determinantes de virulencia del ZIKV delimitados en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

##### **2.2.4.1 Clasificación filogenética del ZIKV: Linajes determinantes de virulencia**

El análisis filogenético muestra que, el ZIKV se puede clasificar en dos linajes: el linaje africano y el linaje asiático (2), el último de los cuales es responsable de la epidemia durante el 2016. A nivel *in vivo* e *in vitro*, se ha establecido que estos linajes tienen un comportamiento diferente tanto en la eficiencia de la transmisión vectorial como en el *fitness* viral (2). En concreto, la tasa de transmisión de ZIKV por *A. aegypti* es más alta en el linaje africano que en el asiático (2). Por otro lado, se ha determinado que -a diferencia de las cepas asiáticas- los aislamientos de ZIKV/africano tienen más eficiencia de infección, generando una alta cantidad de viriones e induciendo una elevada respuesta inflamatoria y muerte celular (2). Numerosos estudios demostraron que los aislados asiáticos de América del Sur tienen bajas tasas replicativas en los tejidos después de un periodo de infección aguda (2). Por lo tanto, la moderada virulencia de los aislados asiáticos, quizás está relacionada con la infección persistente de ZIKV.

##### **2.2.4.2 Genes virales implicados en la virulencia**

Las metodologías computacionales y de experimentación biológica, han permitido identificar una serie de sustituciones nucleotídicas y de aminoácidos que surgieron durante la diseminación del ZIKV de Asia a las Américas (33). Brevemente, (i) la sustitución de la serina por asparagina en la posición 139 (S139N) en la proteína prM, está involucrada en la neurovirulencia; además, (ii) el cambio de A188V está vinculado a la disminución de la

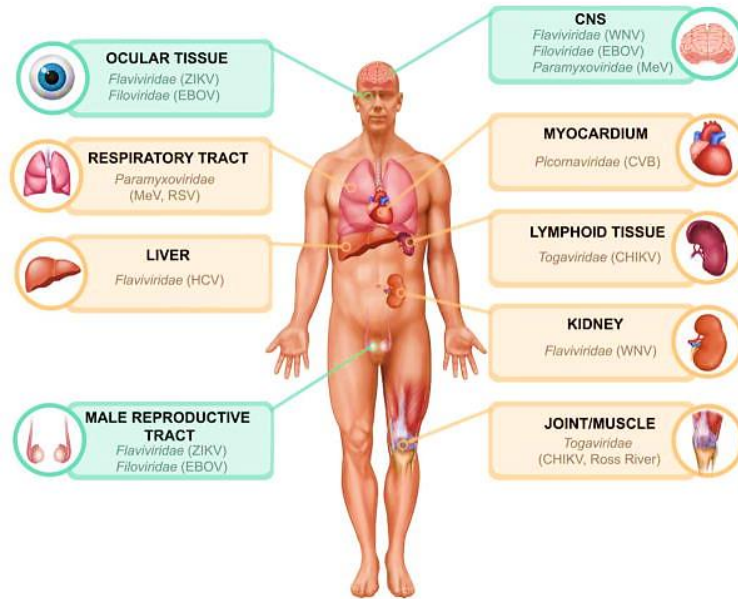
inducción de interferón  $\beta$  mediante la reducción de la fosforilación de TBK1, facilitando la replicación viral (33). Por su parte, (iii) el remplazo de la M2634V en la proteína NS5 (polimerasa viral) no tiene un papel decisivo en *el fitness viral* (33). Finalmente, la mutación de la proteína de envoltura S154N ha estado presente en ambos linajes del ZIKV, aunque no todas las cepas africanas tienen esta modificación, esta variación genética es importante para la infectividad del virus y la neurovirulencia (33).

### **2.2.5 Interacción virus-célula: durante la infección persistente de los virus RNA**

El virus de la HCV y VIH son los agentes infecciosos más reconocidos que ocasionan infecciones persistentes que representan un impacto de salud pública. Sin embargo, existen evidencias que algunos virus reemergentes como el CHIKV, EBOV y el ZIKV pueden producir este tipo de infección (34).

Muchos factores coadyuvan a la persistencia de los virus RNA, es decir, la presencia de viriones o productos virales después de una infección aguda. Estos incluyen una alta variabilidad genética debido a la tasa de error de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y la transcriptasa inversa (RT) utilizadas por estos virus (35). Estas distribuciones de genomas virales no idénticos conceden una habilidad de adaptación que les permite escapar de las presiones del hospedero, como la respuesta inmune, los tratamientos antivirales y profilácticos (36). Además, ciertos sitios anatómicos del hospedero tales como los testículos, tejido ocular y sistema nervioso central se consideran inmunológicamente privilegiados; por lo tanto, la respuesta inmune es controlada. No obstante, otros tejidos corporales, como los pulmones, el miocardio y las articulaciones, que generalmente no tiene privilegio inmune también están asociados con la persistencia de varios virus (**Imagen 3.**) (34). En ese sentido, es importante comprender las estrategias virales que se construyen para este fenómeno.

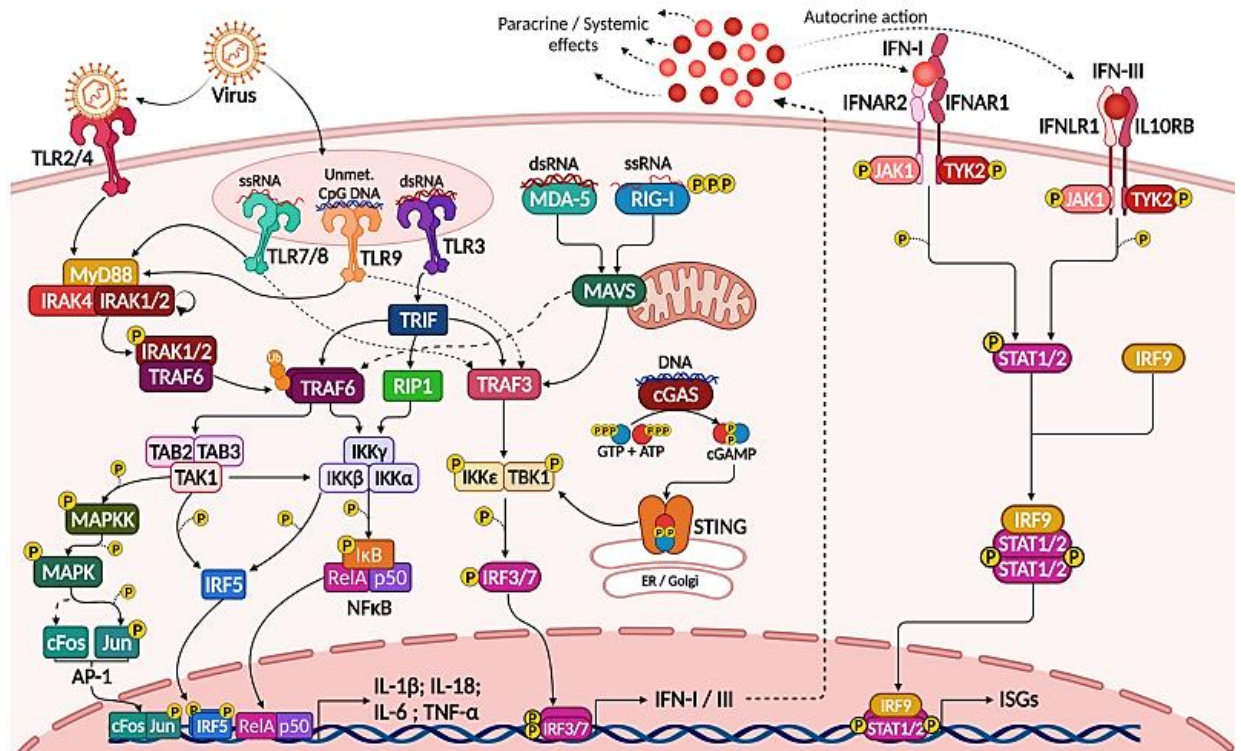




**Imagen 3.** Tejidos asociados con persistencia viral. Diversas familias de virus de RNA persisten en sitios y tejidos inmunoprivilegiados (cuadros verdes/azules) (Tomado de: McCarthy and Morrison. Curr Opin Virol. 2017).

### 2.2.5.1 Inmunidad innata contra virus RNA: flavivirus

El sistema inmune innato es una barrera que limita la diseminación de los flavivirus y otros virus. En un proceso de infección por flavivirus, el RNA viral puede ser detectado a través de sensores moleculares citosólicos conocidos como Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) entre ellos se identifican: los *Toll-like receptors* (TLR), *RIG-Like Receptors* (RLR), *Nod-like receptors* (NLRs), entre otros (37). Cuando el virus es identificado por dichos sensores se activan vías de señalización que inducen a la producción IFN-I (IFN- $\alpha$ , el IFN- $\beta$ , etc.) que posteriormente es liberado para unirse a sus receptores (IFNAR1/IFNAR2) y así, activar la cascada de señalización JAK/STAT para iniciar el estado antiviral y producción de las citoquinas inflamatorias que causan la migración de células inmunes al sitio de infección para el aclaramiento viral (**Imagen 4**). Sin embargo, el exceso de citoquinas puede generar un daño tisular (37).



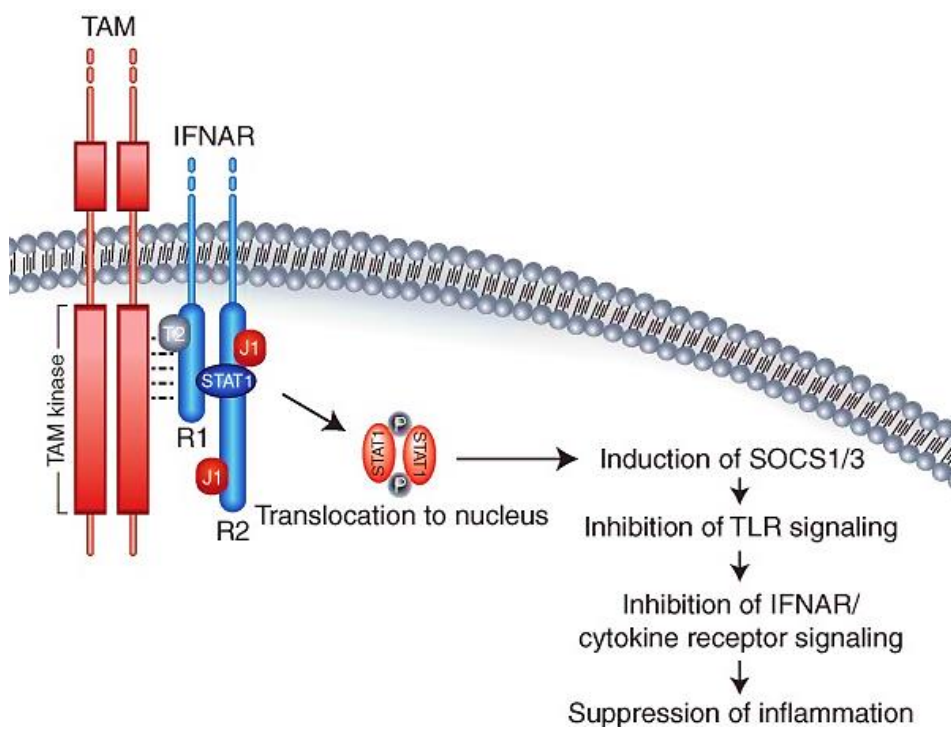
**Imagen 4.** Activación de la respuesta antiviral (IFN-I/III) a través de los PRRs. (Tomado de: Vitiello GAF, Ferreira WAS, Cordeiro de Lima VC y Medina TS. Front. Immunol. 2021)

A continuación, se desglosan algunos métodos que disponen los flavivirus- como el ZIKV- para eludir la respuesta del sistema inmune y activar otras vías de señalización celular para prolongar su ciclo replicativo.

### 2.2.5.2 Estrategia de evasión del sistema inmune por los flavivirus: ZIKV

El IFN tipo I es producido por la mayoría de las células en respuesta a una infección viral gracias a la regulación positiva de ISGs que reducen la replicación viral en diferentes estadios de la infección; como muestra de ello se encuentran: la viperina que se restringe la salida del virión y la oligoadelina sintetasa -1 (OAS-1) que degrada el RNA viral mediante la activación de una enzima RNAsa L (38). Sin embargo, durante las infecciones virales también existen moléculas que promueven un equilibrio que permite que el ciclo de infección continúe, es el caso de la *Suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS-1) que impide la señalización de JAK/STAT (**Imagen 5**).

Se presume que el control sobre la acción de la respuesta inmune ante la infección por ZIKV ocurre desde el momento de la entrada viral. Como se ha mencionado previamente, el receptor AXL (que al igual que los otros receptores TAM, pertenecen a la familia de *receptor tyrosine kinases*) es utilizado para el ingreso del virus. La literatura señala que los receptores de la familia TAM se une al receptor de interferón (IFNR), estos se activan y fosforilan a la Janus quinasa 1 (JAK1); este último fosforila al factor de transcripción STAT1 que se transloca al núcleo y promueve la transcripción de SOCS-1 (13).



**Imagen 5.** Vía de señalización de los receptores TAM-IFNR. (Tomado de: Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5: a009076)

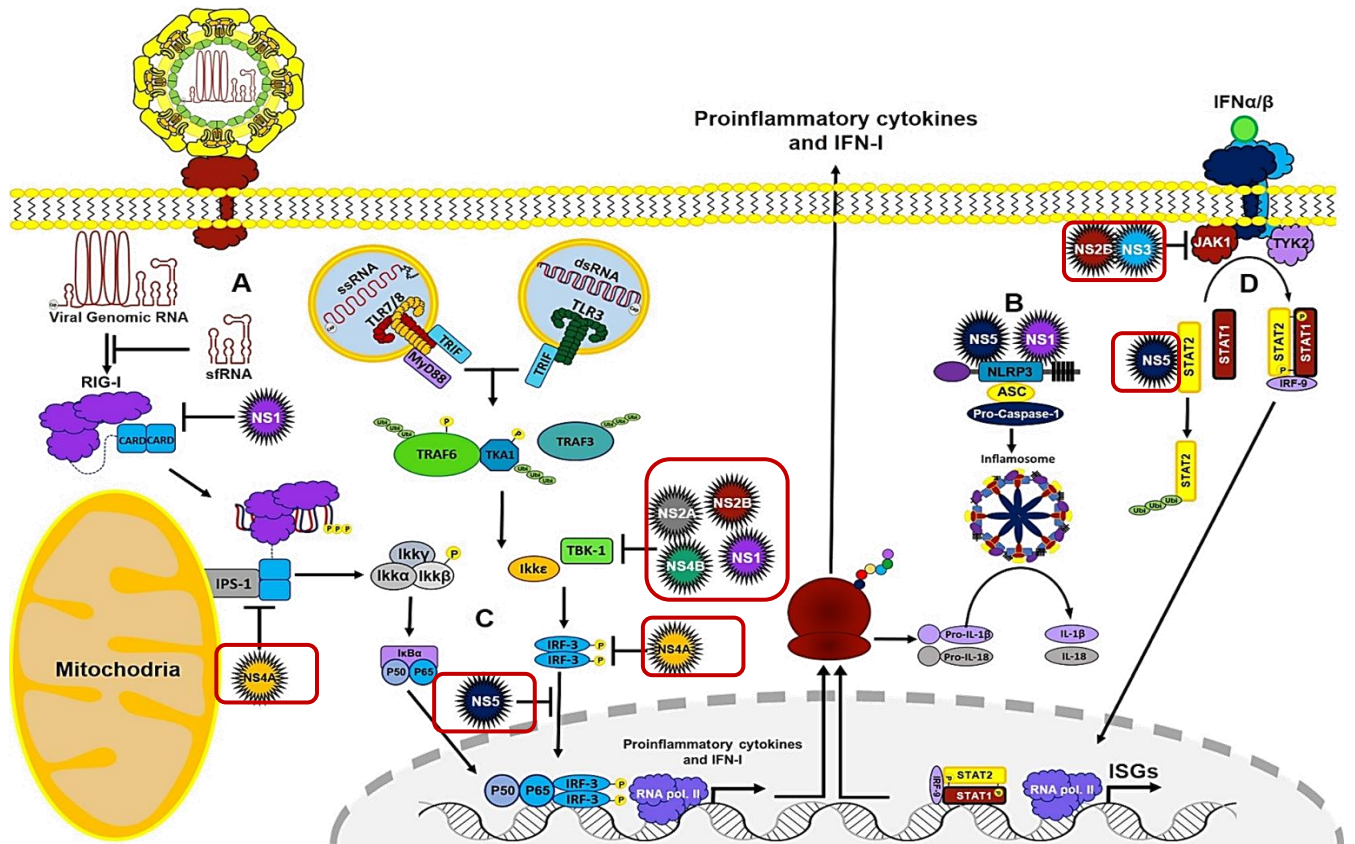
Una investigación demostró que, cuando se inhibió AXL con R428 se disminuyó la fosforilación de STAT-1 y, por ende, la expresión de SOCS -1 (inhibidor de la señalización del interferón). El decremento de esta molécula, activó la producción de IFN- $\beta$  y transcripción de algunos genes antivirales (IFIT1 y MXA) y por lo tanto, la replicación del virus disminuyó (14). Estos datos denotan que, AXL propicia el ingreso de ZIKV y regula negativamente el estado antiviral de las células de Sertoli para aumentar su infección en los

testículos (14). Lo anterior, proporciona nuevos conocimientos sobre la inmunidad antiviral de los testículos y posible persistencia del ZIKV.

Los FVs antagonizan la respuesta antiviral en diferentes etapas de la vía del IFN-I por varios mecanismos donde participan principalmente las proteínas virales no estructurales. Particularmente, la proteína NS5 -además de ser la polimerasa viral- induce la degradación proteasomal del factor de transcripción STAT2 (11, 39). En células dendríticas y endoteliales infectadas con ZIKV, se demostró dicha inhibición de STAT2 y, en consecuencia, se obtuvo una menor expresión de citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 6 (IL-6, amplifica las señales antivirales), el IFN  $\alpha/\beta$  y el ligando 5 de la quimioquina (CCL5, participa en quimiotaxis) (11, 39).

Además, las proteínas NS1, NS4A y NS4B de ZIKV tienen la habilidad de limitar la producción de IFN  $\alpha/\beta$  al bloquear la formación del complejo TBK1 (quinasa 1 de unión a TANK), que permite la oligomerización de factores reguladores de interferón (IRF) que son determinantes para la inducción del IFN-I (11, 39). Por su parte, el complejo de proteínas virales NS2B-NS3 suprime a la vía JAK/STAT por medio de la degradación de JAK 1. Adicionalmente, las proteínas NS1 y NS4A interactúan con RIG-I y MAVS, respectivamente; causando un bloqueo de la vía inductora del interferón.

Por otra parte, el ZIKV, al igual que otros flavivirus, produce un RNA subgenómico, no codificante (sRNA) en el extremo 3'UTR, el sRNA, más que ser un producto de una degradación incompleta del RNA viral, también evade la respuesta antiviral, pues se ha señalado que es una antagonista de RIG-I (39). Conjuntamente, estos hallazgos indican que las proteínas no estructurales del ZIKV, tienen un papel fundamental en la patogénesis viral. A continuación, se resumen algunos mecanismos de evasión antiviral de dichas proteínas (**Tabla. 1**).



**Imagen 6.** Estrategia de evasión inmune de virus Zika. En los cuadrados rojos se señalan aquellas proteínas no estructurales del virus que participan en la inhibición de la respuesta a interferón. (Tomado de: Juan Felipe Valdes y col journal of interferon & cytokine research. 2019)

**Tabla 1.** Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por el ZIKV (13, 11, 39)

<b>Elemento viral/celular</b>	<b>Mecanismo de evasión antiviral</b>
<b>sfRNA</b>	Antagonista de RIG-I.
<b>NS1</b>	Bloquear la formación del complejo TBK1
<b>Complejo NS2B-NS3</b>	Degradación de JAK 1
<b>NS4A</b>	Bloquear la formación del complejo TBK1
<b>NS4B</b>	Bloquear la formación del complejo TBK1
<b>NS5</b>	Induce la degradación proteasomal del factor de transcripción STAT2
<b>Receptor AXL</b>	Promueve la transcripción de SOCS-1 y regula negativamente la respuesta antiviral

### **2.2.5.3 Activación de vías de supervivencia celular durante la infección por flavivirus.**

Los FVs además de antagonizar la inmunidad innata, también tiene la destreza de redireccionar otros procesos celulares que favorecen su replicación (11,39). La apoptosis, por ejemplo, podría eliminar nichos de replicación viral y evitar la propagación. Por lo tanto, muchos virus han desarrollado herramientas para evitar o retrasar las respuestas de muerte celular (40). Se ha definido que, las proteínas virales pueden contrarrestar dichas respuestas, específicamente, en los tiempos tempranos de infección (41, 42). Esta característica es relevante, ya que un determinante viral que limite la muerte celular, en el marco de una infección aguda, puede contribuir al establecimiento de una infección persistente.

La expresión individual de proteínas virales de DENV en células epiteliales permitió identificar que, la proteína NS4A es suficiente para inducir la autofagia dependiente de la vía de fosfatidilinositol- 3-kinasa (PI3K), evitando así la muerte celular (42).

De la misma manera, la infección por el virus de la encefalitis japonesa (JEV) impide la apoptosis por medio de la activación de la vía PI3K, preservando la supervivencia celular en la infección temprana (43). Este mecanismo, también ha sido reportado en la infección por



el WNV, pero en este caso, dicha activación ocurre gracias a la proteína de la cápside que suprime la actividad de las caspasas 3 y 8 (44).

En esa misma línea, el ZIKV tiene la habilidad de posponer eventos de muerte celular. Turpin y col 2019, describieron que una de las cepas epidémicas asiáticas (BeH819015<sup>MC</sup>) y africanas ancestrales (MR766<sup>MC</sup>) de ZIKV podían controlar la apoptosis en células epiteliales humanas infectadas (A549) y en células de glioblastoma-astrocitoma cerebral humano (U251 MG) (45). Según la propuesta de los autores, el RNA viral es suficiente para inhibir la inducción de muerte y la acción anti- apoptótica del virus podría estar asociada a la vía intrínseca y extrínseca (45). Mediante el uso de ABT-737, un inhibidor de proteínas anti- apoptóticas como la Bcl-2 y Bcl-xL, en células infectadas; los investigadores observaron un aumento de la actividad de las caspasas 3/7 comprobando así que, la inhibición de las Bcl-2 y Bcl-xL disminuye el efecto citoprotector que confiere la infección de ZIKV en etapas tempranas (45). De hecho, la participación de la proteína Bcl-2 en la infección por JEV también ha sido revelada por medio de la sobreexpresión de dicha proteína en células BHK y CHO infectadas y a causa de esto, JEV estableció infección persistente (46).

#### **2.2.5.4 Diseminación célula a célula de los flavivirus**

Los virus envueltos -como los FVs- pueden propagarse a través de dos rutas, la primera a través de un medio acuoso y la segunda, por el contacto célula a célula (47).

La diseminación célula-célula es un mecanismo empleado por virus que producen infecciones crónicas es el caso del virus de la hepatitis C (HCV) (48), Virus Herpes simplex (HSV) (49) y el virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) (50). Este tipo de dispersión viral es importante, porque el virus supera algunas barreras, tales como los anticuerpos neutralizantes.

Se ha señalado que, en células de mosquitos (C636) el DENV puede dispersarse por el contacto célula a célula donde participa la tetraspanina C189 (51). De la misma manera, Clark y col 2020., comprobaron que en células progenitoras neuronales, el ZIKV se propaga vía célula a célula en presencia de anticuerpos neutralizantes (52). Estos anticuerpos impidieron la infección inicial del virus libre, pero no inhibieron la propagación intercelular, aunque hubo cierta reducción del tamaño de los focos infecciosos (52). Esto indica que existe un mecanismo de diseminación que no implica la exposición del antígeno de superficie viral al

espacio extracelular, sino que también puede existir dispersión a través de exosomas u otras estructuras hacia las células vecinas (52).

#### **2.2.5.5 Otras interacciones virus-célula: autofagia, estrés de retículo y oxidativo**

La autofagia contribuye en el mantenimiento de la homeostasis celular en respuesta a diferentes estímulos, tales como: especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés de retículo o ausencia de nutrientes; este proceso involucra la degradación y reciclaje de componentes intracelulares (53). Este mecanismo ha sido propuesto como un componente de inmunidad innata; toda vez que puede destruir directamente virus u otros patógenos (54); sin embargo, algunos virus RNA utilizan la autofagia con el fin de promover su ciclo replicativo; entre ellos se destacan: DENV (55), ZIKV (56, 57) y HCV (58). El retículo endoplasmático (RE), es un organelo donde ocurre la síntesis lipídica y proteica; en este último proceso la participación de enzimas residentes y chaperonas cumplen un rol importante en el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas de los ribosomas (59). Adicionalmente, los virus RNA se replican en este compartimento subcelular y esto implica la remodelación del RE para formar paquetes vesiculares donde ocurren la replicación, traducción y ensamblaje viral (19).

La demanda del RE en la asistencia de la síntesis de proteínas celulares y virales ocasiona la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen; promoviendo así, la activación de una vía de señalización llamada *unfolded protein response* (UPR) que mediante diferentes sensores de estrés como PERK, IRE-1 y ATF6, estimulan factores de transcripción que favorecen la producción de chaperonas, inhiben la traducción e impulsan la autofagia; con el fin de disminuir la carga de dicha organela y mejorar así, el plegamiento de proteínas y el reordenamiento del RE (60). Sin embargo, existen proteínas virales que directamente pueden inducir autofagia; este es el caso de las proteínas NS4A (42, 57) y NS4B (57) de ZIKV y DENV y otras de HCV (NS4B, NS5A y NS5B) (61).

La autofagia se constituye en tres mecanismos que se han clasificado acorde a la entrega de material o “carga” a los lisosomas:

**a. Microautofagia:** el material de degradación es directamente liberado dentro de los lisosomas (60).

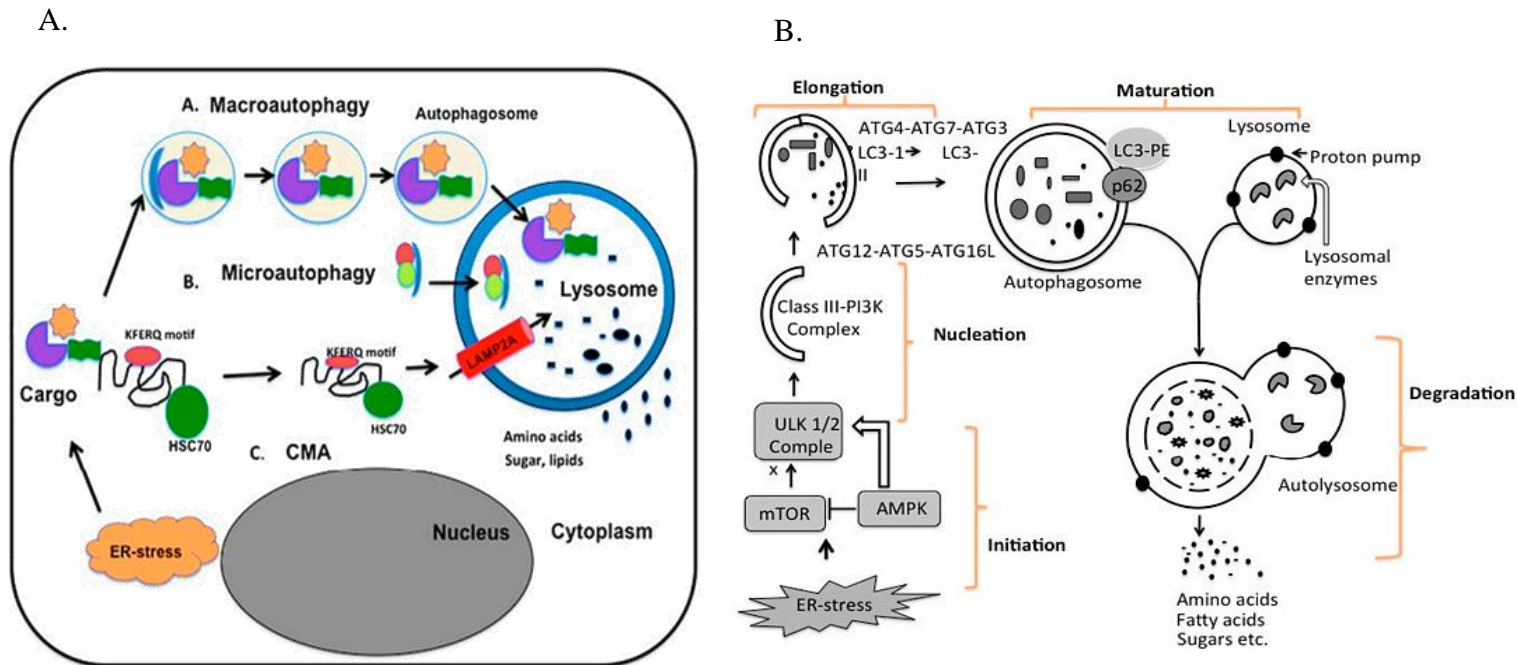


**b. Autofagia mediada por chaperonas (AMC):** consiste en la degradación de proteínas mal plegadas en condiciones de estrés. En esta condición, el sustrato de degradación tiene una secuencia que es reconocida por las proteínas de choque térmico (HSP70) y estas, se unen a proteínas de membranas asociadas a lisosomas como LAMP2 para su posterior proteólisis (60).

**c. Macroautofagia:** consiste en pasos secuenciales que conducen a la formación de un autofagosoma donde se aloja el sustrato, que será entregado al lisosoma para ser degradado (60).

A continuación, se describen los pasos de este proceso y los actores más estudiados:

- **Iniciación:** Es importante mencionar que, la autofagia es inhibida por un complejo llamado mTOR y cuando hay un descenso de nutrientes, energético o estrés de ER, este disminuye y se activa el complejo de iniciación que lo conforman (ULK1/2), ATG13, FIP200 y ATG101 (60).
- **Nucleación:** En este paso, se reclutan proteínas adicionales debido a la interacción con los complejos de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de clase III que consisten en Beclin 1–ATG14L–PI3KCIII–p150–Ambra1 o Beclin 1–UVRAG–PI3KCIII–p150–Bif1. Lo anterior, facilita la nucleación y la creación de una estructura de doble membrana a partir del RE (60).
- **Elongación:** la membrana del fagóforo se extiende mediante sistemas de conjugación de proteínas similares a la ubiquitina. En esta reacción, el complejo ATG12-ATG5 se asocia con ATG16 para formar ATG12-ATG5-ATG16 (ATG16L) (60).
- **Maduración:** La asociación con el complejo Atg5-Atg12-Atg16L forma la membrana de aislamiento. LC3-II se localiza en la membrana de aislamiento alargada en el último paso de la formación del autofagosoma, mientras que el complejo Atg5-Atg12-Atg16L se disocia de ella. Finalmente, la membrana de aislamiento se encierra para formar un autofagosoma (60).
- **Degradación:** En esta etapa, el lisosoma se fusiona con el autofagosoma para formar un autolisosoma, donde el contenido es degradado por hidrolasas lisosomales (60).



**Imagen 7. Tipos de autofagia (a) y macroautofagia (b).** (Tomado de: Srikanta Dash y col *Viruses* 2016, 8(5), 150).

Es posible que la autofagia tenga una función relevante durante las infecciones crónicas virales, pues en biopsias de pacientes con infección crónica por HCV detectaron presencia de LC3B y de vesículas autofágicas (62). Se considera que, la autofagia, además de beneficiar a la replicación de HCV, propicia la supervivencia celular mediante la eliminación de moléculas y organelas que participan en la apoptosis como el P53 y las mitocondrias (mitofagia) (63). Por otro lado, se ha propuesto una comunicación entre la vía interferón y la autofagia durante la infección por HCV, debido a que cuando se elimina componentes de la autofagia (ATG5) o se inhibe dicho mecanismo con inhibidores químicos (bafilomicina o cloroquina) aumenta la producción de interferón (64). Estos elementos en conjunto, pueden incidir para el establecimiento de una infección persistente.

Se desconoce si la autofagia es una herramienta fundamental para la infección persistente del ZIKV. Sin embargo, en las células PC3 expuestas a ZIKV inactivado (Z/I, sin capacidad replicativa) se observaron alteraciones metabólicas (65). Demostrando así, que las proteínas virales son suficientes para inducir cambios celulares. Específicamente, se observaron modificaciones en el metabolismo de algunos lípidos relacionados con autofagia y estrés

mitocondrial; entre ellos se destacan: el fosfatidilinositol, las ceramidas y fosfatidiletanolamina (65).

Además, los autores encontraron que el Z/I genera altos niveles de ROS y mediadores inflamatorios y a su vez, que Z/I puede interactuar con el complejo oligotransferasa del retículo endoplasmático, afectando la glicosilación e induciendo el mal plegamiento de proteínas; generando así, estrés de retículo (65).

Por lo tanto, las condiciones anteriormente mencionadas pueden influir en la inducción de los distintos tipos de autofagia que -eventualmente- promoverán la supervivencia celular durante la infección viral permitiendo así, la persistencia de ZIKV.

### **2.2.6 Manifestaciones clínicas de la infección por ZIKV**

La enfermedad, en ocasiones, es la consecuencia de la infección viral y puede estar asociada con daño celular o tisular. La patogénesis de los FVs ha demostrado la efectividad de la respuesta inmune innata del hospedero para que resista la infección. La muerte celular y la liberación de citoquinas inflamatorias son beneficiosas para que el huésped regule la replicación viral; sin embargo, cuando se pierde el control de estas, la excesiva producción de citoquinas puede ocasionar un detrimento del tejido (66, 67). Por consiguiente, las respuestas del hospedero requieren ser reguladas mientras se mantiene la función antiviral.

La enfermedad por dengue grave se ha relacionado con altos niveles de IL-1RA, CXCL10 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 y quimioquinas (IL-8, CXCL10) (68, 69). En pacientes infectados con ZIKV, se reporta incremento de IL-8, IL-1RA, CXCL10, CCL2, entre otros (70). Por otro lado, en células pulmonares (A549) infectadas con ZIKV, se demostró que la activación de TLR3, un PRR, produce altos niveles de citoquinas inflamatorias, como la IL-6 (71). A continuación, se definen algunas manifestaciones clínicas causadas en el marco de la infección por ZIKV, ya sea por el perfil inflamatorio o por respuesta inmune.

#### **2.2.6.1 Síndrome congénito del ZIKV (CSZ)**

El CSZ consiste en un conjunto de anomalías del sistema nervioso central (SNC) de neonatos infectados con ZIKV, siendo la microcefalia la manifestación clínica más evidente; no obstante, la interrupción parcial del neurodesarrollo trae consigo la disminución de la presión

hidrostática intracraneal, calcificaciones, disminución en la mielinización, lesiones oculares y en la retina.

En análisis *in vitro* e *in vivo* han asociado el CSZ con el daño en el tejido SNC a causa de la presencia de moléculas inflamatorias, tales como la IFN- $\beta$ , IL-12A, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  ya que las citoquinas son mediadores que desencadenan la neurotoxicidad y la producción de ROS y, además, están implicados en la muerte celular (73). Una evidencia de esto, es el aumento de la expresión de la Caspasa 3 en el parénquima cerebral; por lo tanto, la apoptosis es el factor principal en la muerte de las células neuronales y la reducción de la masa cerebral en humanos.

Otro factor de la biología de la infección viral que podría estar asociado a CSZ es que durante la infección por ZIKV en células progenitoras neurales presentan estrés de retículo por activación de la vía UPR, lo que puede resultar en la suspensión de la neurogénesis por apoptosis (74).

#### **2.2.6.2 Síndrome de Guillain-Barré (SGB)**

El SGB es una neuropatía que se adjudica a un proceso autoinmune secundario a la infección por ZIKV, consiste en una reacción cruzada de los antígenos virales y gangliósidos de la membrana neuronal. Lo anterior, se desenlaza en la pérdida de mielina y, por consiguiente, una alteración en la conductividad nerviosa, lo que puede provocar debilidad, parálisis y en algunos casos, muerte (75).

Existen otros causantes del SGB, entre ellos: (i)cambios evolutivos del virus que contribuyen a la diversificación del tropismo hacia el sistema nervioso periférico y (ii) previa estimulación inmunológica obtenida por infecciones con otros flavivirus como DENV. Este último factor se propone por las evidencias obtenidas en una mujer de 40 años infectada con ZIKV durante la epidemia de 2013 en la Polinesia Francesa, pues a los 7 de días de la infección la paciente presentó signos de SGB (76). Este hallazgo fue relacionado con análisis serológicos que indicaron una infección reciente por ZIKV e infecciones resueltas por DENV 1-4 (76).

#### **2.2.6.3 Manifestaciones en el sistema reproductor masculino: prostatitis**

En casos clínicos de pacientes masculinos infectados con ZIKV, se reportan síntomas y signos como hematospermia, prostatitis, oligospermia, alteraciones morfológicas y motoras de los espermatozoides y presencia de leucocitos en las secreciones seminales; este último,

un indicador de inflamación, promoviendo así alteraciones en la calidad del semen y posiblemente, con implicaciones en la fertilidad (4).

La próstata es una glándula que aporta una variedad de nutrientes que contribuyen a la calidad del líquido seminal y, por ende, a la viabilidad del espermatozoide (7). Aproximadamente, entre el 5-10% de los casos de prostatitis, están vinculados a agentes microbiológicos (4). En infecciones crónicas por *E. coli*, se han detectado cambios morfológicos en las membranas y mitocondrias de los espermatozoides, con disminución en la motilidad y en el recuento de estas células (4,9). Si bien, la esterilidad puede verse afectada por un daño directo hacia las células germinales también la respuesta inmune ante las infecciones puede mediar la disfunción de los espermatozoides.

En las prostatitis crónicas que no responden al tratamiento de agentes antimicrobianos, posiblemente por infecciones crípticas, se han evidenciado un perfil de moléculas inflamatorias en el semen, como es el caso de: citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), y ROS, cada una de estas implicadas en la reducción de la calidad del semen (7).

La inflamación crónica a causa de las infecciones, pueden tener implicaciones, no solamente, en la salud reproductiva; sino también en perturbaciones a nivel de la arquitectura del tejido prostático (7,9); tal como el incremento del tamaño que es originado por el estímulo de citoquinas que promueven la secreción de factores de crecimiento y neovascularización; a pesar de que este crecimiento del tejido puede ser benigno, en otras ocasiones puede presentarse malignidad.

En ratones se identificó que, la inflamación crónica inducida por *E.coli* producía estrés oxidativo y que además, esto se encuentra vinculado con el daño en el DNA y cambios neoplásicos (9).

Aunque, no ha sido elucidado la repercusión de la infección persistente de ZIKV en tejido prostático, la experiencia con otros agentes infecciosos demuestra la relevancia biológica que tiene identificar aquellos factores que puedan alterar su funcionamiento.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El CSZ fue una de las patologías más frecuentes y severas durante la epidemia del ZIKV en el 2016. La presencia del virus en el semen por un periodo prolongado en pacientes vasectomizados y no vasectomizados, plantea que el SRM es un foco de transmisión

importante para aquellas mujeres gestantes; pues el virus puede atravesar la barrera placentaria y generar trastornos en el neurodesarrollo del feto, pero además de ello, permite cuestionar posibles consecuencias en la fertilidad masculina y otros efectos colaterales originados por este tipo de infección, enfocándonos principalmente, en el impacto que puede tener la infección persistente por ZIKV en la glándula prostática; toda vez que a diferencia de los testículos, es un órgano inmunocompetente y asimismo, participa activamente en la calidad del semen. Por tal motivo, en esta investigación se pretende identificar algunas interacciones virus-célula que promueven el establecimiento de la persistencia de ZIKV en células de próstata.

#### **4. OBJETIVOS**

##### **4.1 Objetivo general**

Evaluar factores inmunes y celulares asociados a la infección persistente del ZIKV (COL345Si) en las células de adenocarcinoma de próstata (PC3).

##### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la susceptibilidad y permisividad de las células PC3 a la infección por el ZIKV.
2. Demostrar la capacidad del virus ZIKV de establecer una infección persistente en las células PC3.
3. Examinar algunos procesos biológicos y virales asociados a la persistencia del ZIKV en las células PC3.
4. Identificar cambios en el fenotipo celular ocasionados durante la infección persistente.

## **5. HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

### **5.1 Hipótesis nula**

El virus Zika no establece infección persistente en las células PC3

### **5.2 Hipótesis alternativa**

El virus Zika establece infección persistente en las células PC3

### **5.3 Pregunta de investigación**

Los antecedentes descritos previamente que señalan la importancia de transmisión sexual del ZIKV, propician la formulación de los siguientes interrogantes:

1. ¿El virus Zika establece infección persistente *in vitro* en células de próstata?
2. ¿Cuáles son los mecanismos que podrían estar implicados durante la infección persistente por ZIKV?
3. ¿Existen alteraciones fenotípicas celulares de la infección persistente por ZIKV?

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Líneas celulares y virus**

Para realización de los ensayos biológicos se utilizaron las células PC3 ATCC® CRL1435 (adenocarcinoma de próstata humana), las células Vero E6 ATCC® (riñón de mono verde africano) y las células BHK-21 ATCC® CCL-10™ (riñón de hámster). Cada una de las líneas celulares fueron mantenidas con DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado e incubadas a 37 °C en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%. Los medios de cultivo se suplementaron además con penicilina (100 unidades/mL) y estreptomina (100 mg/mL).

El virus del ZIKV COL345Si GenBank: MH179341.1 pase #6 se aisló de *Aedes aegypti* y fue suministrado por Juan Felipe Valdés López (Grupo Inmunovirología de la Universidad de Antioquia), el aislado de ZIKV Dakar, fue empleado como control. Para la amplificación viral, se utilizó la línea celular Vero E6. Las células se infectaron con MOI = 0,01 del respectivo virus y se incubaron durante tres días hasta que se observó un efecto citopático; luego, los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -80 °C hasta su uso.

Adicionalmente, se emplearon los virus: DENV 1 y 2 (pase#6) los cuales son aislados clínicos donados por el Instituto Nacional de Salud-Colombia (INS). Por otro lado, DENV-

3 y 4 (pase#2) fueron obsequiados por Andrea Trujillo, miembro del grupo de Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales- de la Universidad de Antioquia (PECET).

## **6.2 Infección del ZIKV (COL345Si) en las células PC3**

### **6.2.1 Caracterización del aislamiento colombiano del virus Zika COL345Si (MH179341.1)**

Cuatro secuencias consenso ZIKV codificadas en el *gene bank*: **MH179341.1** (ZIKV COL345Si), **MH544701** (ZIKV/ Meta-Colombia 2016), **KU501215** (ZIKV/PRVABC59), **KJ776791.2** (ZIKV/Francesa Polinesia), **KU955593.1** (ZIKV/Cambodia), **AY632535.2** (ZIKV/ Uganda), **KU955591.1** (ZIKV/Dakar) y **KM204118.1** (Dengue Nueva Guinea) fueron alineadas en el programa MUSCLE. Posteriormente, se realizaron árboles filogenéticos basados en la secuencia génica completa, y se infirió su historia evolutiva utilizando el método de Máxima Verosimilitud (ML) del software MEGA 6.0, con una prueba de arranque (1000 repeticiones) (77). Según la herramienta jModelTest, el mejor modelo de sustitución de nucleótidos que se ajustó a la matriz de secuencias considerando la información Akaike (AIC) y Bayesiana (BIC) fue Tamura-Nei (77).

### **6.2.2 Detección de los receptores AXL y TIM-1**

La expresión de los receptores celulares se analizó en  $2 \times 10^4$  células/pozo en presencia o ausencia de la infección. Para esto, se emplearon las técnicas de: citometría de flujo, *In-Cell Western* (ICW) y microscopía de fluorescencia.

Para el ICW, el marcaje de los receptores se realizó acorde a los protocolos descritos por la casa comercial de cada anticuerpo. Las células previamente fijadas (PFA 4%), fueron permeabilizadas y se les adicionó una dilución 1:200 de anti-AXL (ab89224) y 1:200 de anti-TIM-1 (Bio-legend, San Diego, CA, EE. UU.). Posteriormente, el marcaje fue revelado con IRDye 680LT (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU.). Además. se empleó el anticuerpo para  $\alpha/\beta$ -tubulina (TU-10, Invitrogen™, Waltham, MA, EE. UU.) como *housekeeping gene* y se reveló con IRDye 800CW (LI-COR Biosciences). Finalmente, la detección se realizó con el sistema Odyssey (LI-COR Biosciences).

Para la detección de los receptores por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, las células fueron tripsinizadas y fijadas con PFA al 4%, respectivamente. Posteriormente, se realizó el marcaje con una dilución 1:200 de anticuerpos anti-AXL (ab89224) y 1:200 de anti-TIM-1 (Biolegend 353902, San Diego, CA, EE. UU.) de acuerdo con los protocolos de



la casa comercial. Para cada marcador se utilizó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EE. UU.) y la tinción de núcleos se realizó con Hoechst 33342 (H1399, Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EE. USA) (78). Finalmente, las muestras se analizaron con un citómetro (BD FACS Canto II, by Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) y un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX83P2ZF). Para finalizar, se realizaron tres experimentos independientes y para comparar la cantidad de la IMF de cada receptor se empleó la prueba T Student de datos no apareados para determinar la significancia de los datos (\*):  $p < 0.05$ .

### **6.2.3 Replicación del virus zika en células PC3**

#### **6.2.3.1 Curva de crecimiento viral**

Luego de evaluar el porcentaje de infección del ZIKV en las células PC3, con diferentes multiplicidades de infección (MOI), las células PC3 y Vero E6 se infectaron con una MOI= 1; y luego, la adherencia de los viriones se llevó a cabo durante 1h a 4°C y posteriormente, se incubó por 2 h (37 °C al 5 % de CO<sub>2</sub>) para permitir la entrada viral. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS 1X y se agregó DMEM FBS al 2 %, e incubaron a 37°C durante 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-infección (h.p.i) (79). Los sobrenadantes y células se colectaron en los tiempos previamente definidos y se almacenaron a -80°C para su posterior titulación y cuantificación de genomas virales. (79).

Para la titulación viral, las células Vero E6 se infectaron con los sobrenadantes previamente colectados de las células PC3 y Vero E6 (79). La infección se realizó durante 2 h a 37 °C (5 % de CO<sub>2</sub>), y posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se adicionó un medio semisólido preparado con carboximetilcelulosa (CMC) al 1,5 %, y DMEM FBS al 2 % (79). Finalmente, la infección se incubó durante 6 días a 37° C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> donde se observó la formación de placas virales. Las células Vero E6 se incluyeron como control debido a que, estas células son permisivas a la infección por ZIKV. La dinámica viral fue evaluada mediante tres experimentos independientes.

#### **6.2.3.2 Cuantificación de RNA viral**

La cuantificación del RNA viral fue determinada por tres experimentos independientes. Para esto, a extracción de RNA viral se realizó con el kit comercial RNeasy de Qiagen (NC9307831, Hilden, Alemania) a partir de las células infectadas, en un ambiente libre de

RNAsa. Para la cuantificación RNA viral de polaridad positiva (RNA<sup>+</sup>), se realizó la síntesis del cDNA de ZIKV utilizando el kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase de Thermo Fisher Science. (18080051, Waltham, MA, EE. UU.) y los *random primers* de Promega (PR-C1181, Madison, WI, EE. UU.). La cuantificación de RNA<sup>+</sup> se llevó a cabo por qPCR, utilizando *primers* específicos de ZIKV, ***Foward***: 5' CTGTGGCATG AACCCAATAG 3' y ***reverse***: 5' ATCCCA-TAGAGCACCCTCC 3', y el Supermix BIORAD SsoFast™ EvaGreen® (172 5204, Hercules, CA, EE. UU.) (80).

La cuantificación del RNA viral de polaridad negativa (RNA<sup>-</sup>), se realizó a través de la síntesis del cDNA antigenoma usando el kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase de Thermo Fisher Science, EE. UU y el primer ***Foward***: 5' CAATATGCTG AAACGCGAGAGAAA. Posteriormente, la cantidad de RNA<sup>-</sup>, se estimó como se mencionó anteriormente (80). La cantidad de RNA viral se normalizó con el *housekeeping gene* GAPDH ( $\Delta\Delta Ct$ ) para reportar el *fold change*.

#### **6.2.3.3 Viabilidad celular**

Para establecer el porcentaje de viabilidad de las células PC3 y Vero E6 infectadas (MOI=1), se utilizó la técnica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La viabilidad celular se determinó a las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h.p.i. según el protocolo reportado por Roa-Linares et al. 2016 (81). Finalmente, la lectura de absorbancia se realizó en un lector ELISA (Microplate reader, BioRad) a una longitud de onda de 570 nm (OD<sub>570</sub>). Los datos de absorbancia se analizaron en el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 y se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (M  $\pm$  SD) de dos experimentos independientes que se realizaron por triplicado (81).

#### **6.2.3.4 Evaluación de la respuesta antiviral en células PC3**

El RNA total se extrajo con el kit Qiagen RNeasy siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit de síntesis de cDNA SuperScript™ III de Thermo Fisher Science de acuerdo con las instrucciones del fabricante (82). Los productos de cDNA se amplificaron mediante RT-qPCR utilizando un conjunto de *primers* específicos para varios genes, como se describe en la Tabla 2 (82).

La expresión relativa de cada gen diana se normalizó con respecto al control no infectado y al *housekeeping gene* GAPDH ( $\Delta\Delta Ct$ ) para reportar el *fold change*. El *fold change* de 0.5 y 1.5 se consideraron como la regulación negativa y positiva de la expresión génica,

respectivamente (82). La comparación del *fold change* IFN-  $\beta$  con respecto a los niveles de los genes antivirales y SOCS- se llevó a cabo por la prueba de ANOVA de dos vías. La significancia de los datos se estableció con (\*):  $p < 0.05$ .

**Tabla 2.** *Primers* empleados para la amplificación del interferón- $\beta$  y genes antivirales

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
INF- $\beta$ 1	5'-CGCCGCATTGACCATCTA-3'	5'-GACATTAGCCAGGAGGTTTCTCA-3'
Viperina	5'-AAATGCGGCTTCTGTTTCCAC-3'	5'-TTGATCTTCTCCATACCAGCTTCC-3'
<i>Oligoadenylate synthetase 1</i> (OAS-1)	5'-GTGTGTCCAAGGTGGTAAAGG-3'	5'-CTGCTCAAACCTTCACGGAA-3'
<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i> (SOCS-1)	5'-CACTTCCGCACATTCCGTTC-3'	5'-CACGCTAAGGGCGAAAAAGC-3'
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5' GCCCAATACGACCAAATCC-3'.

### **6.3 Evaluación de la infección persistente del ZIKV (COL345Si) en las células PC3**

Se estandarizó un modelo de infección persistente que fue monitoreado hasta las 8 semanas post-infección (s.p.i) (Fig. S1). Para seleccionar el periodo de estudio de la persistencia del ZIKV, se promediaron aquellos tiempos donde se detectó el virus en tejido prostático de monos y ratones (42 y 21 dpi) y del aislamiento del virus en semen de pacientes vasectomizados (69, 77 y 96 dpi).

Además, para el mantenimiento del cultivo infectado, se tuvo en cuenta variables como el pH, la mínima concentración de FBS que permitiera la proliferación celular y la morfología típica de las células PC3 (Fig. S1).

Considerando lo anterior, 350.000 células/pozo se infectaron a una MOI=1 durante 1h a 4°C para permitir la adherencia de viriones y luego se incubaron a 2h a 37°C para el ingreso viral. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el inóculo viral y las células fueron lavadas con PBS 1X y se agregó DMEM al 1% de FBS. Cada 7 días el cultivo infectado fue monitoreado y se colectaron sobrenadantes y células para determinar el título viral (PFU/mL), los genomas virales (RT-qPCR) y la presencia de proteína de envoltura y dsRNA (microscopía de fluorescencia). Es importante mencionar que, las células PC3 no

producen placas virales, por tal motivo, la titulación de los sobrenadantes virales almacenados, se realizó en las células Vero E6.

La recolección de muestras anteriormente mencionadas fue llevada a término hasta las 8 semanas post-infección (s.p.i). Las células no infectadas se emplearon como control del experimento y se realizó el mismo procedimiento anteriormente mencionado hasta 8 s.p.i. Por otra parte, ZIKV/Dakar (linaje africano) y los serotipos de DENV (1-4) fueron incluidos como control negativo de infección no persistente en las células PC3, ya que los reportes bibliográficos indican que, ZIKV/Dakar genera muerte celular y que, DENV (también perteneciente al género flavivirus) establece infección aguda.

La persistencia viral se definió como el cultivo de células PC3 infectado con ZIKV con capacidad de producir viriones, sintetizar genomas virales de polaridad positiva o negativa (RNA+ o RNA -) o expresar proteína viral y dsRNA viral hasta las 8 s.p.i, sin evidenciar efecto citopático.

### **6.3.1 Genómica comparativa de los virus secuenciados**

Las muestras derivadas de los sobrenadantes del cultivo persistente fueron preparadas y secuenciadas siguiendo los protocolos de la tecnología de *nanopore*. Teniendo en cuenta la cinética viral en el curso de la infección persistente, se seleccionaron los tiempos 0.14 (24 h.p.i), 2, 3 y 8 s.p.i para su procesamiento. Para ello, se utilizó el secuenciador MinION (Oxford Nanopore Technologies.). Para detectar los cambios del genoma viral se realizó la metodología explicada en el numeral 6.2.1 (77).

### **6.3.2 Transcriptómica de la infección persistente en células PC3 y análisis bioinformático**

#### **A. Obtención del RNA-seq**

El RNA total se extrajo del cultivo persistente con el kit Qiagen RNeasy siguiendo el protocolo de la casa comercial y se almacenó a -80°C. Finalmente, las muestras fueron secuenciadas empleando la tecnología de última generación llamada DNBSEQ- G50 de MGI.

#### **B. Ensamble del RNA-seq**

Después de la secuenciación, los datos fueron normalizados y almacenados en formato FASTQ, utilizando FastQC ([google/vFqiZ](https://www.bioinformatics.org/FASTQC/)). La ubicación de las lecturas en el genoma de referencia fue determinada con precisión comparando las lecturas con el genoma de referencia (GRCh38 o virus del dengue tipo 2 [NC\_001474]) utilizando el software HISAT2

(83). Luego, los nuevos transcritos fueron ensamblados mediante el software StringTie (84) y empleando la herramienta featureCounts en el software Subread (85), se obtuvo el número de conteo crudo en cada muestra.

### **C. Anotación de datos y corrección de efectos *batch***

Los recuentos brutos fueron analizados en el software R (versión 4.2.0) (86). Inicialmente, se anotaron las filas de genes con su respectivo genotipo (gen no codificante, pseudogen y gen codificador de proteínas), símbolos y entrezID. Con base en el genotipo, se seleccionó aquellos genes codificadores de proteínas y posteriormente, se generó una lista con sus longitudes utilizando la biblioteca Homo.sapiens (87). Finalmente, se corrigieron los efectos batch en los datos de recuento brutos para cada transcriptoma usando el método ComBat seq (88).

### **D. Análisis de genes diferencialmente expresados (DEGs)**

Para determinar los principales DEGs, se seleccionaron los genes con una tasa de falsos descubrimientos (FDR) < 0,05 y Log2 Fold Change (FC) (tratado/no tratado) > 0,6, utilizando la biblioteca DESeq2 (89). Los genes diferencialmente expresados fueron analizados en Cytoscape (versión 3.9.1) (86) y con el complemento ClueGO (versión 2.5.9) (87), se realizó el análisis de enriquecimiento con parámetros predeterminados, fusión de términos GO y con  $p \leq 0,05$ . Por último, la expresión génica (mRNA) relativa se normalizó calculando lecturas por transcritos por millón de lecturas mapeadas (TPM).

## **6.3.3 Hallazgos fenotípicos del cultivo persistente**

### **6.3.3.1 Detección de receptores AXL y TIM-1**

La detección de receptores AXL y TIM-1 se llevó a cabo con el protocolo previamente descrito en el numeral 3.2.2 (78).

### **6.3.3.2 Detección de mRNA del receptor de andrógeno y la proteína citoqueratina 18 (CK-18)**

Para la cuantificación de mRNA del receptor androgénico y la proteína CK-18 se usó el procedimiento previamente mencionado en el numeral 6.2.3.4. Para ello, se emplearon los *primers* descritos en la tabla 3 (82).

**Tabla 3.** *Primers* utilizados para cuantificar el receptor de andrógeno y CK-18

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>Receptor de andrógeno</b>	5'-GGTGAGCAGAGTGCCCTATC -3'	5'-GCAGTCTCCAAACGCATGTC -3'
<b>Citoqueratina 18 (CK-18)</b>	5'-GCAAAGCCTGAGTCCTGTCCT -3'	5'-TGGAGCGAGTGGTGAAGCTC -3'

La expresión relativa de cada gen diana se normalizó con respecto al control no infectado y al *housekeeping gene* GAPDH ( $\Delta\Delta Ct$ ) para reportar el *fold change*. El *fold change* de 0.5 y 1.5 se consideraron como la regulación negativa y positiva de la expresión génica, respectivamente.

### 6.3.3.3 Evaluación de la expresión de la CK18

Las células infectadas con ZIKV fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min a 37°C y suspendidas en PBS 1X. Luego, 200 uL de las células se dispersaron en el *cytofunnel* para ser centrifugadas en el *cytospin* (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA) durante 5 minutos a 500 RFC, con el fin de concentrar las células presentes en la suspensión (90). Finalmente, la concentración celular es obtenida en un portaobjeto donde se realizó la inmunohistoquímica del marcador de interés, en este caso, la CK18. Para ello, el “Ultra V Block” (Ultravision Kit Quanto Detection System HRP DAB, Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, EE. UU.) fue adicionado a los portaobjetos durante 5 minutos y se retiró con Tris buffer salino con Tween (TBS-T) (90). Luego, se agregó 100 µL de la dilución 1:20 del anticuerpo anti- mouse CK18 donado por Juan Pablo Mejía-Cupajita, durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó con TBS-T. Para amplificar la reacción del anticuerpo primario, se empleó el reactivo Quanto amplificador de anticuerpos primarios (Ultravision Kit Quanto Detection System HRP DAB, Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, EE. UU.) durante 10 minutos y se lavó con TBS-T. Para finalizar, la reacción fue revelada con el polímero HRP Polymer Quanto reagent (kit Ultravision Quanto Detection System HRP DAB, Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, EE. UU.) y diaminobencidina (DAB) siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, para identificar la estructura celular, los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina-eosina (90).

Para la lectura, los portaobjetos fueron escaneados en el Ventana DP 200 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza) y posteriormente, se calculó el porcentaje de inmunorreactividad utilizando el software QuPath v. 0.2.3

#### **6.3.3.4 Evaluación de respuesta inflamatoria durante la infección persistente**

La respuesta inflamatoria durante la infección persistente de ZIKV ha sido reportada en fluidos biológicos de pacientes (28). Por tal motivo, se evaluó dicha respuesta en las células PC3 infectadas persistentemente con ZIKV con el *kit human inflammatory cytometric bead array* (CBA) que fue obtenido de BD Biosciences (San José, CA, USA). Este *kit* fue empleado para detectar la presencia de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF $\alpha$  de los sobrenadantes colectados en el curso de la infección durante las 8 s.p.i, siguiendo el protocolo de la casa comercial. Brevemente, 50  $\mu$ L de perlas fueron incubadas con 50  $\mu$ L de las muestras o estándares y anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE) a temperatura ambiente por 3 h. Posteriormente, se les adicionó buffer de lavado a las perlas, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante para resuspender las perlas en 100  $\mu$ L de buffer y analizarlas por el citómetro de flujo BD (Facs Canto II, by Becton Dickinson). Las concentraciones de citoquinas se calcularon con base a la interpolación de una curva obtenida de los estándares.

#### **6.3.3.5 Análisis estadísticos**

Para comparar la cantidad de la IMF de los receptores, la expresión génica y proteica de la CK-18 se empleó la prueba T Student de datos no apareados para determinar la significancia de los datos. (\*):  $p < 0.05$ . La comparación de los *fold change* de los genes antivirales y SOCS-1 estudiados a las 120 hpi se llevó a cabo por la prueba de ANOVA de dos vías (\*):  $p < 0.05$ .

## **7. RESULTADOS**

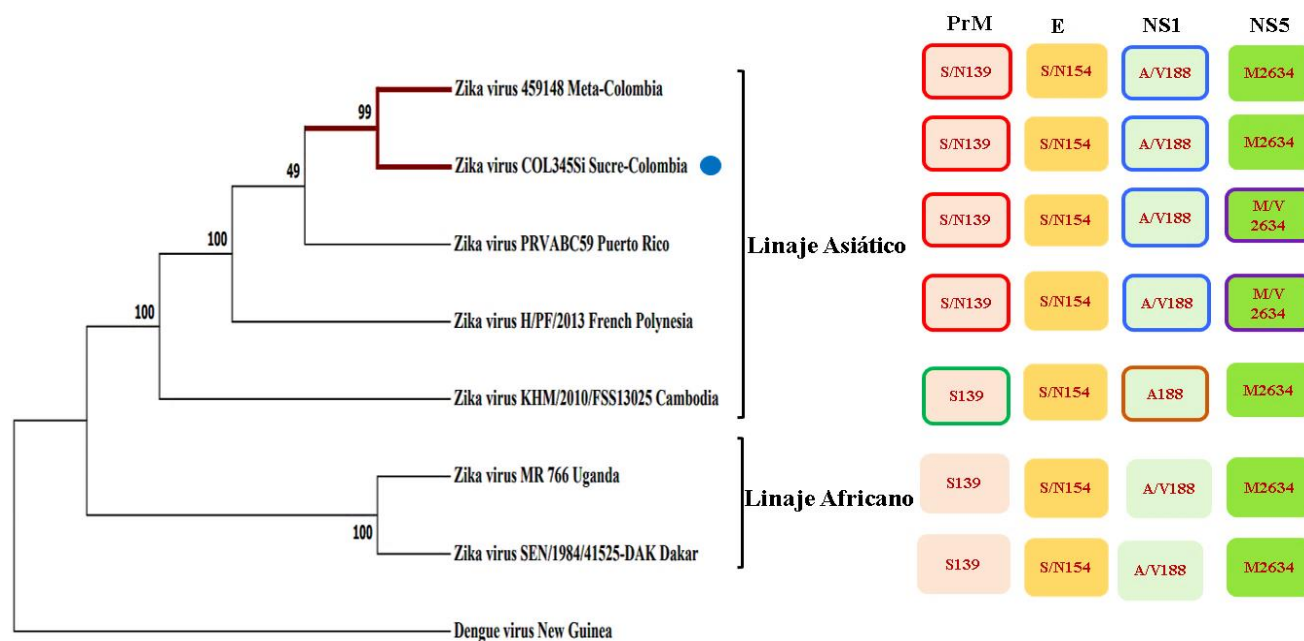
### **7.1 Caracterización de la infección del ZIKV (COL345Si) en las células PC3**

#### **7.1.1 El aislado colombiano del virus Zika COL345Si (MH179341.1) tiene características similares al linaje asiático-americano.**

Con el fin de conocer la historia filogenética del aislado Zika COL345Si, su secuencia fue comparada con otras de genoma completo disponibles en GenBank, que tienen distintos orígenes geográficos (Puerto Rico, Polinesia Francesa, Camboya, Uganda y Dakar) y la cepa del virus del dengue de Nueva Guinea (DENV) como grupo externo para esta inferencia.

Luego del alineamiento, se evidencia que el aislado colombiano, al igual que otras cepas contemporáneas, conserva mutaciones en las proteínas: NS1(A188V), prM (S139N), envoltura (S154N) y NS5 (M2634V) (**Fig. 2**). También se reportan otras mutaciones en las proteínas estructurales y no estructurales (91) (Fig. S2). Cabe señalar que el aislado colombiano, en comparación con las otras cepas, tiene una mutación en la cápside, correspondiente a una sustitución de ácido aspártico por ácido glutámico en la posición 107 (C: D107E) (Fig. S2).

La inferencia filogenética mostró que los dos aislamientos colombianos (de las provincias de Meta y Sucre) están más estrechamente relacionados con los virus Zika de Puerto Rico. Estas cepas, junto con aislados de la Polinesia Francesa y Camboya, constituyen un clado (linaje asiático), evolutivamente más distante a las cepas africanas.



**Figura 2.** El aislado COL354Si pertenece al linaje asiático. La figura muestra el árbol filogenético de varias cepas del virus zika y dengue en comparación con el aislado COL354Si GenBank: MH179341.1 (indicado con un punto azul). Los recuadros resaltados en colores, muestran algunas mutaciones relevantes en la patogénesis del virus.

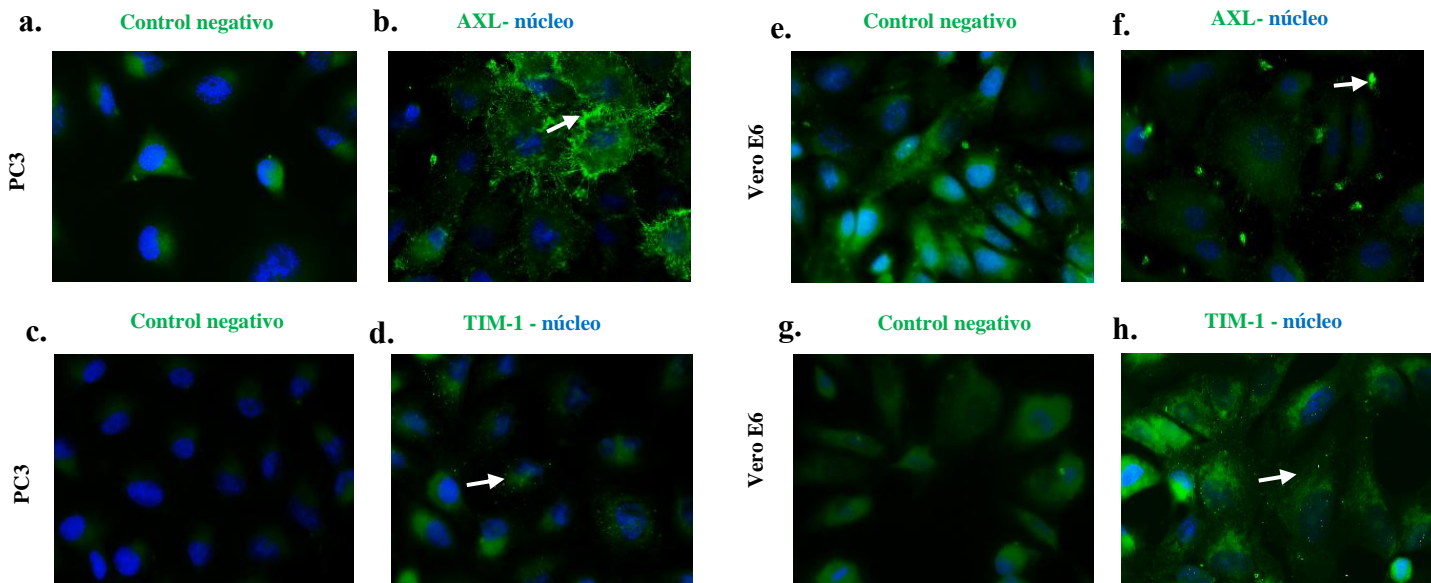
### 7.1.2 Las células de adenocarcinoma de próstata (PC3) expresan los receptores AXL y TIM-1

Teniendo en cuenta que AXL y TIM-1 son receptores de varios flavivirus e incluso del virus del Ébola (92), evaluamos la expresión de estos receptores en células sin infección.



En células PC3 (**Fig. 3B**) y VeroE6 (**Fig.3F**), el receptor AXL muestra un patrón de expresión granular con una ubicación importante en la membrana celular (indicada por flechas). Mientras que la detección de TIM-1 es citoplasmática (**Fig. 3D** y **3H**).

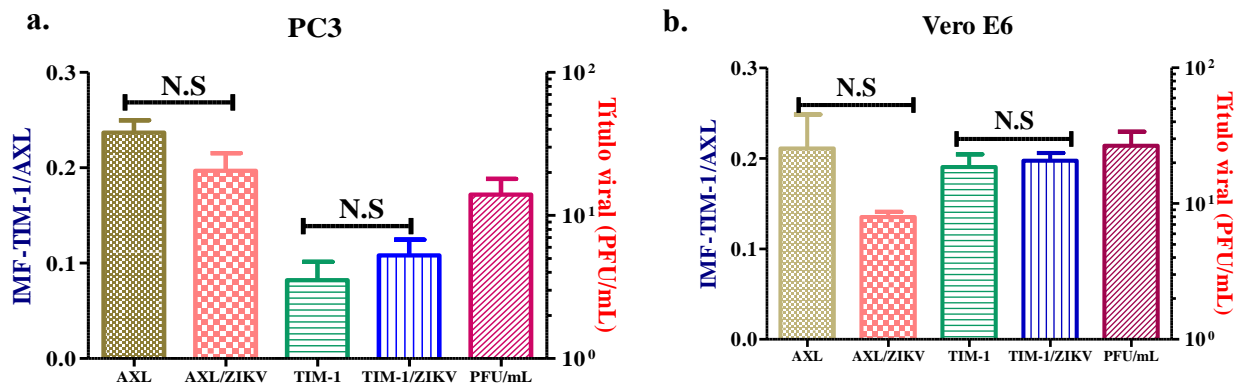
Estos resultados fueron consistentes, cuando se confirmaron con la metodología de *In- Cell Western* (**Fig. S3**).



**Figura 3.** Las células PC3 y Vero E6 expresan receptores celulares AXL y TIM-1. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 60X y representan la ubicación subcelular de AXL (b, f) y TIM-1 (d, h) y corresponden a tres experimentos triplicados independientes. AXL y TIM-1 (verde), y núcleos (azul). Los controles negativos corresponden a células marcadas con anticuerpo secundario (Alexa fluor 488).

Una vez identificada la distribución subcelular de los receptores para ZIKV, se determinó el impacto de la infección viral en la expresión de dichos receptores, pues es conocido que AXL inhibe la respuesta a IFN. En ese sentido, se exploró durante la infección si AXL incrementaba la expresión para ejercer una modulación antiviral y, además, también se examinó la expresión de TIM-1. Para ello, las células fueron inoculadas con una MOI= 1 de ZIKV durante 24 h.p.i., y se observó que, la infección no altera la intensidad media de fluorescencia (IMF) de AXL y TIM-1 en las células PC3 (**Fig. 4A**) y Vero E6 (**Fig. 4B**). Sin

embargo, cuando la línea celular PC3 se infectó con una MOI=3, la expresión del receptor AXL aumentó (Fig. S3).



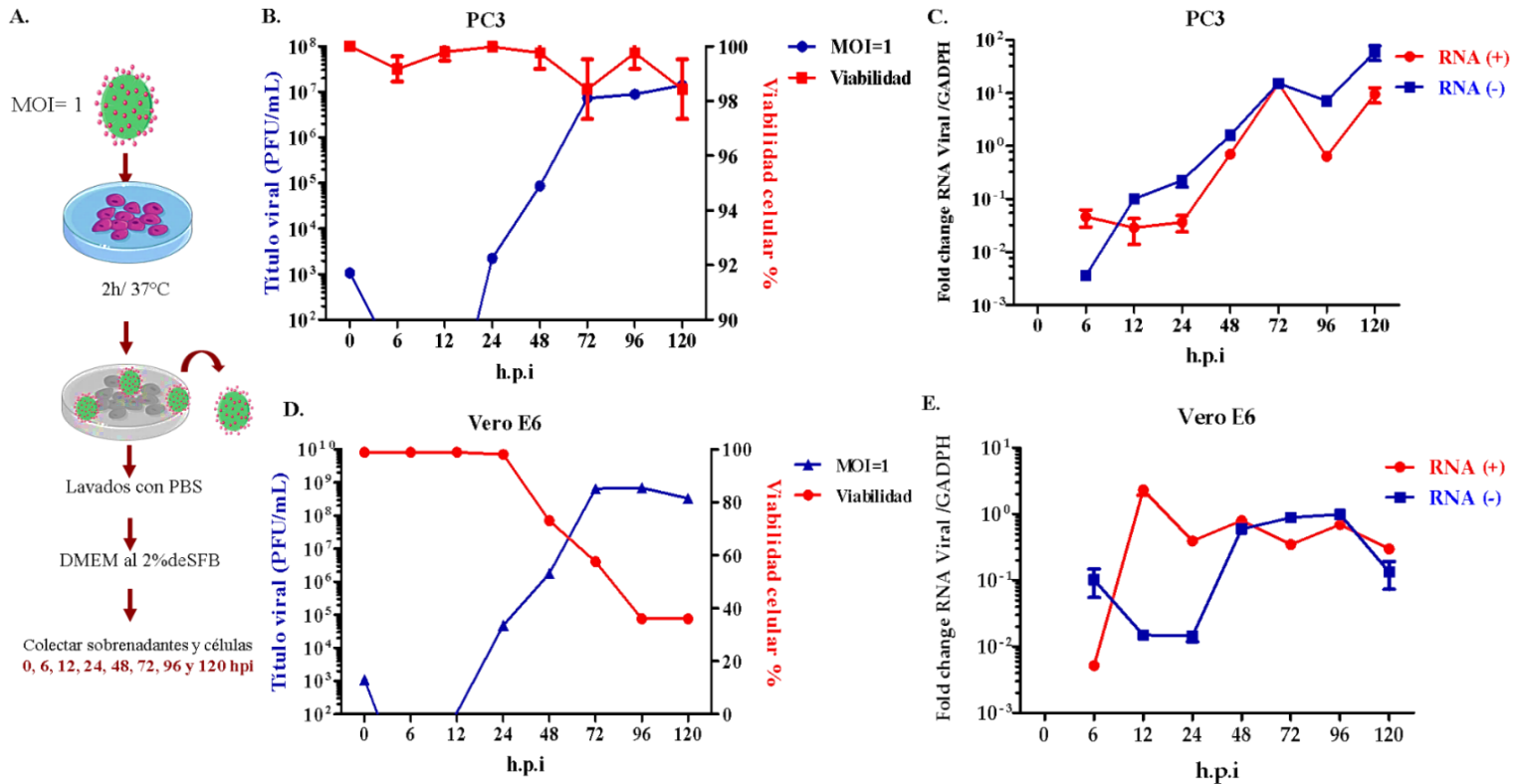
**Figura 4.** Expresión de los receptores AXL y TIM-1 en PC3 (a) y Vero E6 (b). La presencia de los receptores AXL y TIM-1 en células infectadas durante 24 h y no infectadas se detectó mediante citometría de flujo y la intensidad media de fluorescencia (IMF) fue normalizada con el número de células. El análisis muestra la media  $\pm$  el SEM (medio de error estándar) de tres experimentos independientes. La prueba T Student de datos no apareados para determinar la significancia de los datos (\*):  $p < 0.05$ .

### 7.1.3 El aislado colombiano de ZIKV se replica en las células PC3

Una vez demostrada la expresión de los receptores celulares para ZIKV, se evaluó la dinámica de crecimiento viral. Para determinar el porcentaje de infección del ZIKV, las células PC3 y Vero E6 fueron inoculadas con varias MOI (0.1, 1 y 3) (Fig. S4) y teniendo en cuenta el porcentaje de infección obtenido, se eligió una MOI=1 para infectar las células y evaluar el ciclo de replicación del virus. La cinética viral determinada por unidades formadoras de placa en las células PC3 (Fig. 5A) y Vero E6 (Fig. 5C) demostró que, la fase de eclipse ocurre a las 6 y 12 h.p.i. La liberación de viriones se observó a las 24 h.p.i. alcanzando un pico elevado a 72 h.p.i. Además, se evidenció que, las células PC3 (Fig. 5A) tienen una producción constante de virus hasta 120 h.p.i., sin alteraciones en la actividad metabólica celular y sin ocasionar efecto citopático (CPE) (Fig. S5). Por el contrario, en las células Vero E6, la liberación de viriones disminuye a las 120 h.p.i. (Fig. 5C), este hallazgo es consistente con la pérdida de viabilidad celular y presencia de CPE (Fig. S5).

Aunque la producción de viriones en células PC3 es constante, con relación a la síntesis de genomas virales, los RNA de polaridad positiva y negativa aumentan a las 24, 48 y 72 h.p.i (Fig. 5B) con una disminución a las 96 h.p.i. (Fig. 5B). Este comportamiento no se detectó

en las células Vero E6, donde la síntesis del genoma es constante y decrece a las 120 h.p.i (Fig. 5D).



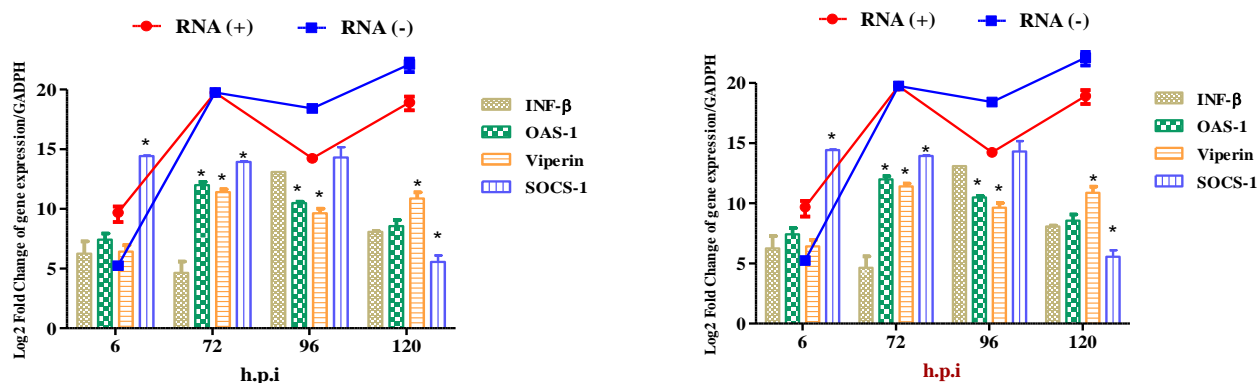
**Figura 5.** Dinámica de replicación de ZIKV en células PC3. En el gráfico (a) se muestra el esquema experimental del ciclo replicativo de ZIKV. La cinética viral se determinó en células PC3 (b-c) y Vero E6 (d-e) infectadas con una MOI= 1 durante 0-120 h.p.i, y 0 h.p.i corresponde al *input* viral. La caracterización del ciclo replicativo se estableció mediante unidades formadoras de placa (b, d) y la cuantificación de genomas virales (c, e). El análisis muestra la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

### 7.1.4 ZIKV modula la respuesta antiviral en las células PC3

Teniendo en cuenta la dinámica de los genomas virales sintetizados en las células PC3, los tiempos de infección de 6, 72, 96 y 120 h.p.i. fueron elegidos para evaluar la respuesta antiviral en estadios tempranos y tardíos de la infección.

El perfil detectado muestra la presencia de un inhibidor de la respuesta antiviral, SOCS-1, desde las 6 h.p.i hasta las 120 h.p.i. (Fig. 6A). La expresión de ISGs como OAS-1, Viperina y SOCS-1 se detectó entre 6-120 h.p.i. (Fig. 6A) que interfieren con algunos pasos del ciclo

replicativo viral; por el contrario, SOCS-1 inhibe la respuesta antiviral. Además, las células Vero E6 no mostraron una respuesta inmune en contraste con las células PC3. Por lo tanto, no se detectaron los ISGs (**Fig. 6B**). La ausencia de respuesta inmune y del inhibidor SOCS-1 en las células Vero E6 explica la eficiente replicación del virus y muerte celular a las 120 h.p.i.



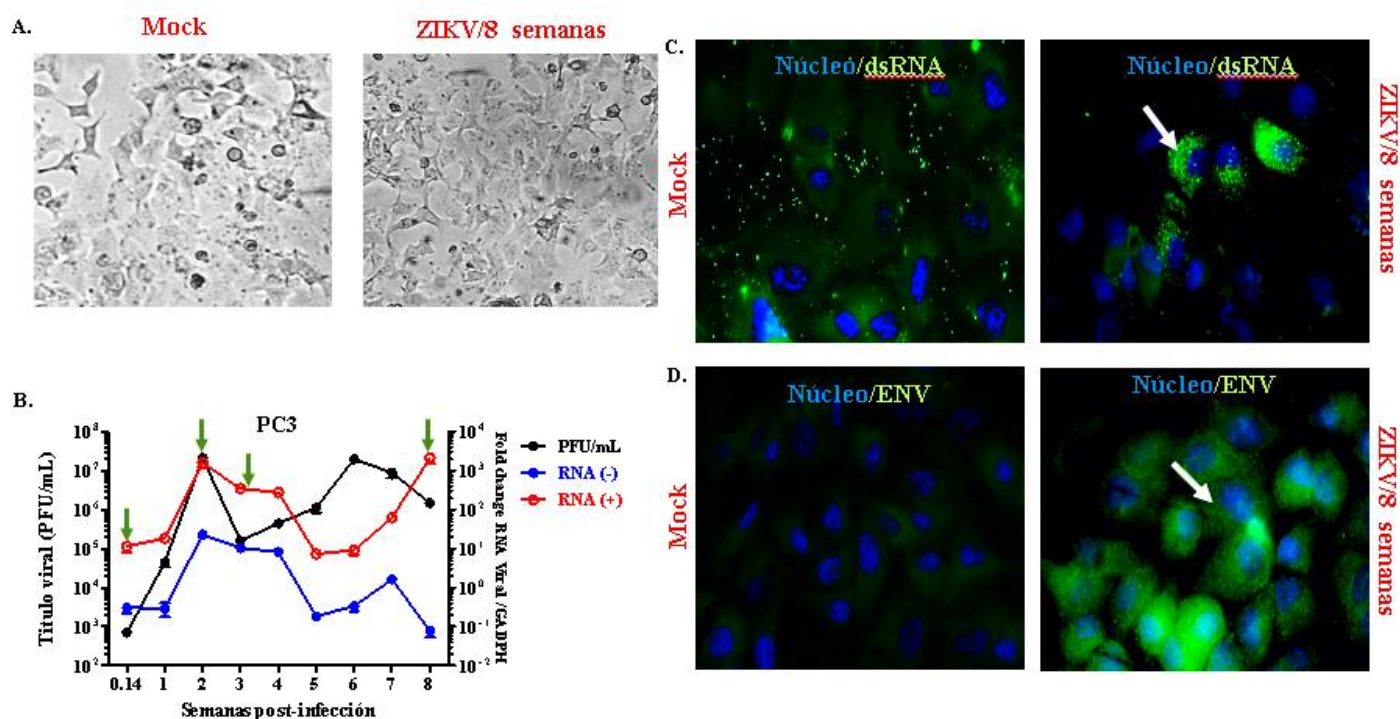
**Figura 6.** Respuesta inmune innata frente al virus del Zika en células PC3. La expresión de mRNA de proteínas antivirales (OAS1, Viperina y SOCS-1) en células PC3 (a) y Vero E6 (b) infectadas con ZIKV se evaluó a las 6, 72, 96 y 120 h.p.i mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Log<sub>2</sub> Fold Change (FC) de (PC3 infectadas/PC3 no infectadas). El fold change de 0.5 y 1.5 se consideraron como la regulación negativa y positiva de la expresión génica, respectivamente. La comparación de los fold change de los genes antivirales y SOCS-1 estudiados a las 120 hpi se llevó a cabo por la prueba de ANOVA de dos vías (\*):  $p < 0.05$ .

## 7.2 Evaluación de la infección persistente del ZIKV (COL345Si) en las células PC3

### 7.2.1 ZIKV establece infección persistente en la línea celular PC3

Se determinó que las células PC3 establecen persistencia hasta las 8 s.p.i (**Fig. 7B**) y esto se evidenció, mediante la producción PFU/mL (**Fig. 7B**), síntesis de genomas virales (**Fig. 7B**), detección de intermediarios replicativos (**Fig. 7C**) y de la proteína de envoltura (**Fig. 7D**).

Es importante destacar que, este tipo de infección se establece en ausencia de efecto citopático (**Fig. 7A**). Teniendo en cuenta las dinámicas de replicación del ZIKV en el cultivo persistente, se pudo identificar que la primera progenie viral se obtiene a las 0.14 s.p.i y un mayor rendimiento a las 2 s.p.i; posteriormente se detectó un descenso de las PFU a las 3 s.p.i.



**Figura 7.** El aislado colombiano de ZIKV establece infección persistente en las PC3. La dinámica de replicación viral fue determinada a MOI=1 durante 8 semanas, teniendo como punto de partida el tiempo de 24 horas-postinfección (h.p.i), que en dicha dinámica viral equivale a 0.14 s.p. i (b). A las 8 s.p.i no se evidenció efecto citopático (b). La cuantificación viral se expresó en unidades formadoras de placa y RNA viral de polaridad (+) y negativa (-) (b). Además, se detectó la presencia de RNA viral de doble cadena (c) y de la proteína de envoltura viral (d).

(**Fig. 7B, ver flechas**) y luego estos, títulos virales se restablecieron en los tiempos ulteriores, con decremento de las PFUs a las 8 s.p.i.

Asimismo, con el fin de confirmar si la infección persistente del aislado de ZIKV era producto de una interacción específica de ZIKV con las células PC3, se realizó el mismo esquema experimental para los diferentes serotipos de DENV (1-4) en pases jóvenes (N°2-

Nº6) (Fig. **S6, S7**), un flavivirus que se caracteriza por inducir una infección aguda, y también se utilizó el linaje africano de ZIKV/Dakar, la cual pertenece a un linaje diferente del virus de interés. Se observó que, las células PC3 infectadas con cada serotipo de DENV y ZIKV/Dakar, lograron una infección productiva pero menos eficiente en comparación con ZIKV COLsi. Lo anterior, demostrado por la cuantificación de las PFUs, y revelaron un efecto citopático con distintas cinéticas (Fig. **S6, S7**). Por consiguiente, se comprobó el hallazgo de la persistencia del aislado COL345Si de ZIKV en las células de adenocarcinoma de próstata.

### **7.2.2 El virus ZIKV realiza cambios en su genoma durante la infección persistente**

El tiempo prolongado de la infección y la alta tasa mutación de ZIKV, conllevó a intuir que la dinámica observada en los tiempos :0.14, 2, 3 y 8 (s.p.i), fue debido a mutaciones virales (**Fig. 7B**). Por tal razón, se analizaron las secuencias genómicas de la progenie viral en las respectivas ventanas temporales y así, compararlas con la secuencia parental de Zika COL345Si.

La progenie viral obtenida a las 8 s.p.i presentó cambios en las proteínas estructurales tales como; E (E683K) y (T760M) y la proteína de pre-membrana (H205R). Asimismo, se identificó una mutación en una proteína no estructural, la NS1(R897T) (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Mutaciones virales identificadas durante la persistencia de ZIKV del aislado colombiano ZIKV COL345Si

ZIKV	PrM	E	E	NS1
<i>Wild type</i>	205 H	683E	760T	897R
<b>0.14 (s.p.i)</b>	205R	683E	760T	897R
<b>2 (s.p.i)</b>	205R	683E	760M	897T
<b>3 (s.p.i)</b>	205R	683E	760M	897T
<b>8 (s.p.i)</b>	205R	683K	760M	897T

### 7.2.3 La infección persistente del ZIKV regula la vía de autofagia y la respuesta a interferón.

Además de identificar los cambios en el genoma viral durante este tipo de infección, es fundamental reconocer aquellas respuestas celulares en el curso de esta. Basados en la misma interpretación de la cinética viral, se seleccionaron los tiempos anteriormente mencionados en el numeral 4.2.2.

Durante el curso de la infección persistente se regulan diferentes procesos biológicos en los tiempos evaluados (Fig. **S8**). Para el caso de la infección temprana que corresponde a las 0.14 s.p. i (24hpi), se resaltan la autofagia y la respuesta inmune, esta última regulada en los tiempos posteriores (Fig. **S8**) debido a su importancia en el ciclo replicativo de los flavivirus. Cada uno de dichos procesos, fueron monitoreados en los tiempos posteriores (2, 3 y 8 s.p.i), con el fin de detectar las dinámicas de estas vías de señalización durante la persistencia del ZIKV.

El perfil transcripcional muestra que, la autofagia tiene un rol protagónico a las 0.14 y 2 (s.p.i) regulando positivamente los componentes asociados a la formación del auto-fagosoma (Fig. **8B**). La regulación positiva de la fase de iniciación tiene importancia en el tiempo

temprano de la infección (**Fig.8A**). Curiosamente, hay un control transcripcional de los genes relacionadas a la unión con la auto fagolisosoma (RAB-7 y LAMP-1) (**Fig.8C**) y degradación (Catepsinas B, D y ATP6V0A1, implicadas en la hidrólisis de proteínas y acidificación lisosomal, respectivamente.) (**Fig.8C**) durante la persistencia de ZIKV. En contraste, con los tiempos tardíos de la infección (3 y 8 s.p.i), la autofagia se encuentra subregulada (**Fig. 8A-C**).

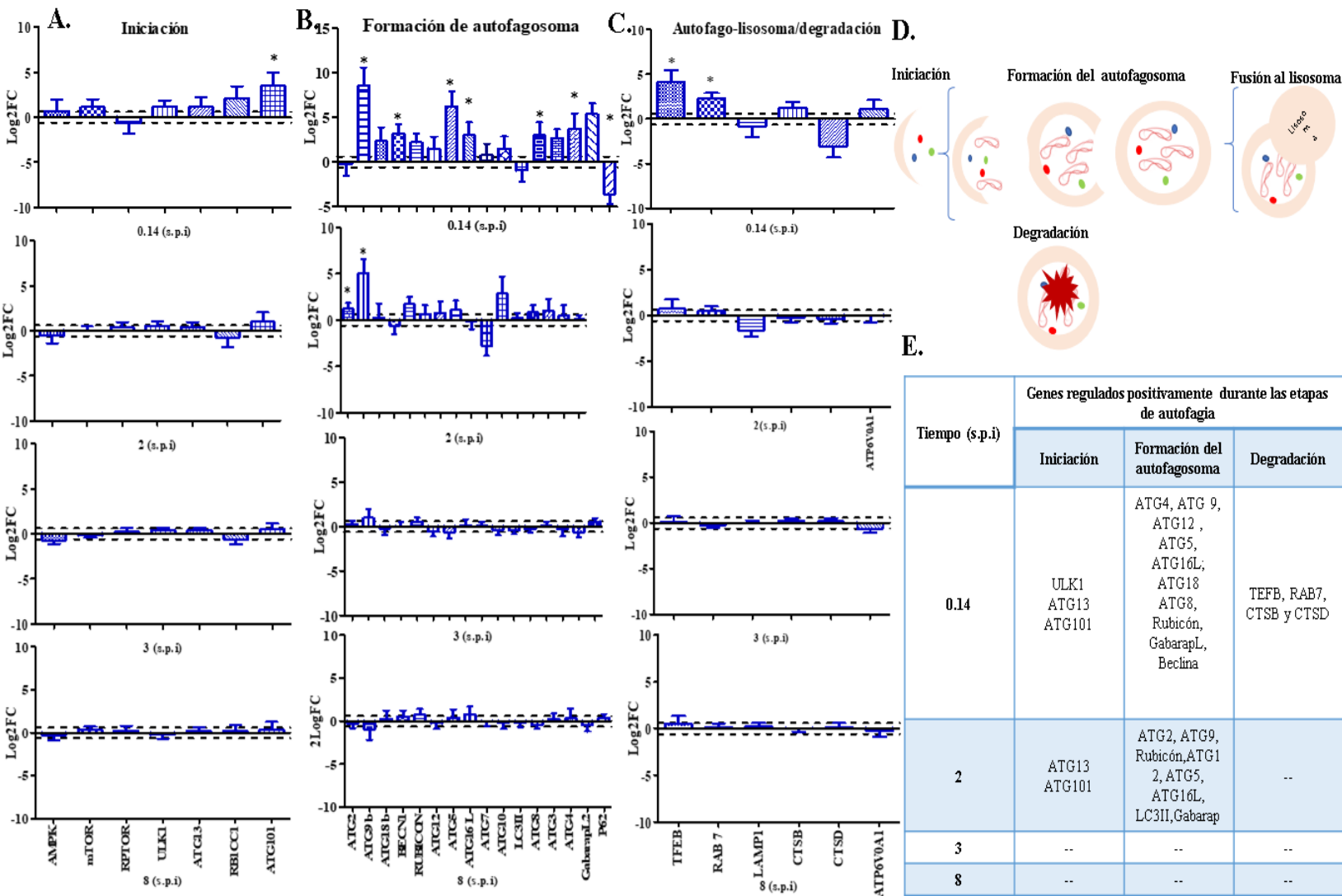
Con relación a , la respuesta inmune se evidencia que, hay una posible estado antiviral desde las 0.14 s.p.i por la tendencia al incremento de los genes de los interferones (IFN) tipo I ( $\beta$ ), II ( $\gamma$ ) y III ( $\lambda$ ) (**Fig.9A** ); adicionalmente, se observó una regulación positiva de algunos componentes de la vía JAK/STAT (JAK2, TYK2, STAT1) (**Fig.9B** ) y la detección de genes antivirales (OAS-1, ISGs15 e IFITM1) (**Fig.9C**). Asimismo, se encontraron algunos de los inhibidores de la vía en mención, USP18 y SOCS-1(**Fig.9B**).

Actualmente, la literatura ha sugerido que la IL-27 tiene una función similar al interferón durante la infección por ZIKV y CHIKV (129), por medio de la activación la vía JAK/STAT. Por tal motivo, se determinó el perfil transcripcional de la IL-27 (**Fig.9A**) y su activador EBI3 (**Fig.9A**). Sin embargo, en este caso no se obtuvo regulación positiva de la IL-27.

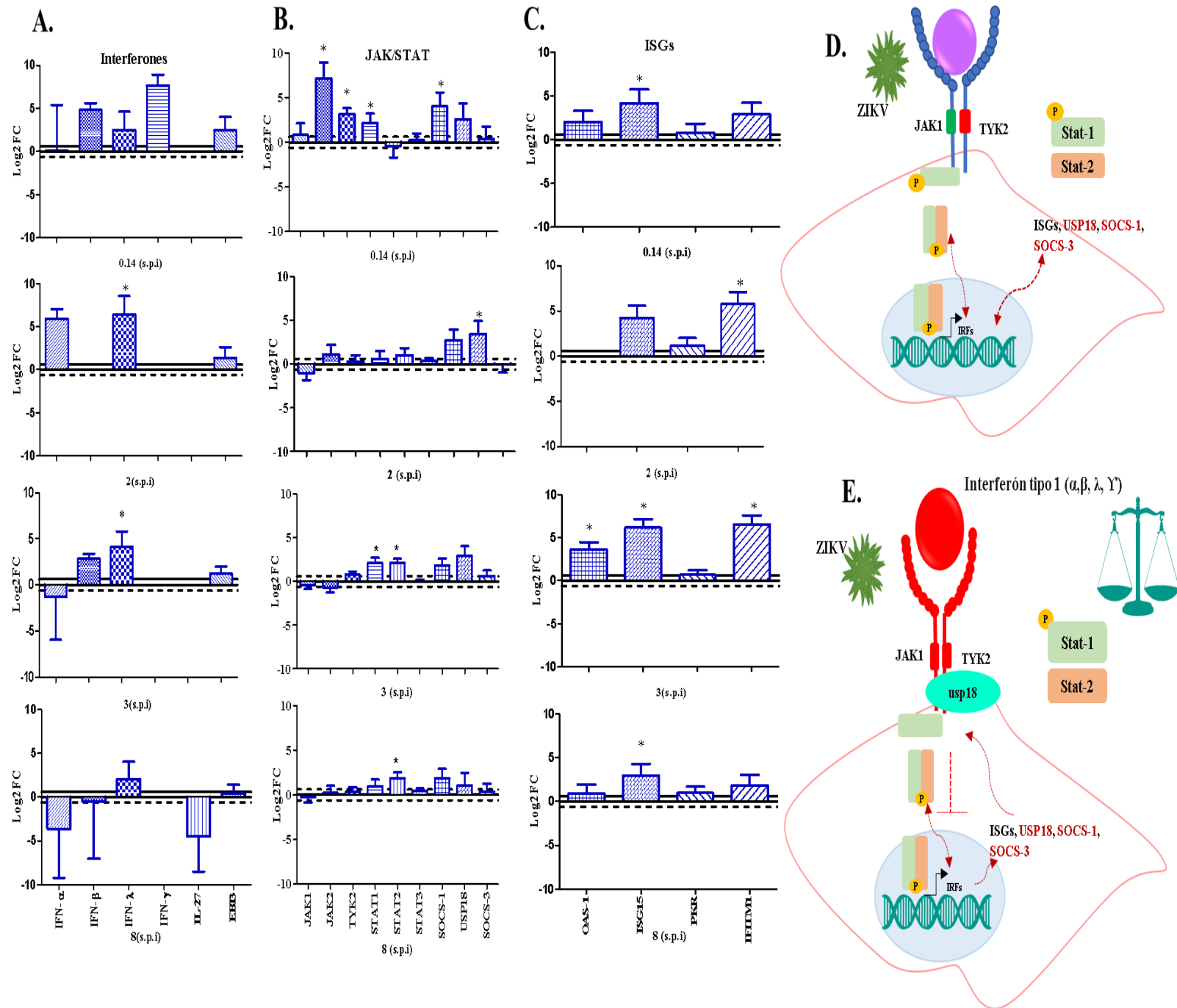
A partir de las 2 s.p.i, pese a obtenerse un *fold change* significativo del IFN- $\lambda$  (**Fig.9A**), los genes de la vía JAK/STAT no se regulan positivamente (**Fig.9B**); sin embargo, hay una tendencia al incremento de los genes inducidos por el IFN (ISGs) (**Fig.9C**). Por el contrario, durante las 3 y 8 s.p.i hay potencialmente una reconstitución de los factores de transcripción de la vía (STAT 1 y 2) (**Fig.9B**) y esto, es consistente con el incremento significativo de algunos genes antivirales.



La regulación positiva de los inhibidores USP18 y SOCS-1 (**Fig.9B**) estuvo presente durante la infección persistente, lo que sugiere una modulación de la respuesta antiviral frente al ZIKV, estableciéndose así un equilibrio entre la infección y respuestas celulares que pueden contener la infección.



**Figura 8.** La infección persistente del ZIKV regula dinámicamente la autofagia (a-c). El gráfico (d) es una representación del proceso de autofagia. La tabla (e) resume los genes de autofagia regulados positivamente en los tiempos monitoreados. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (\*): valor de  $p < 0,05$

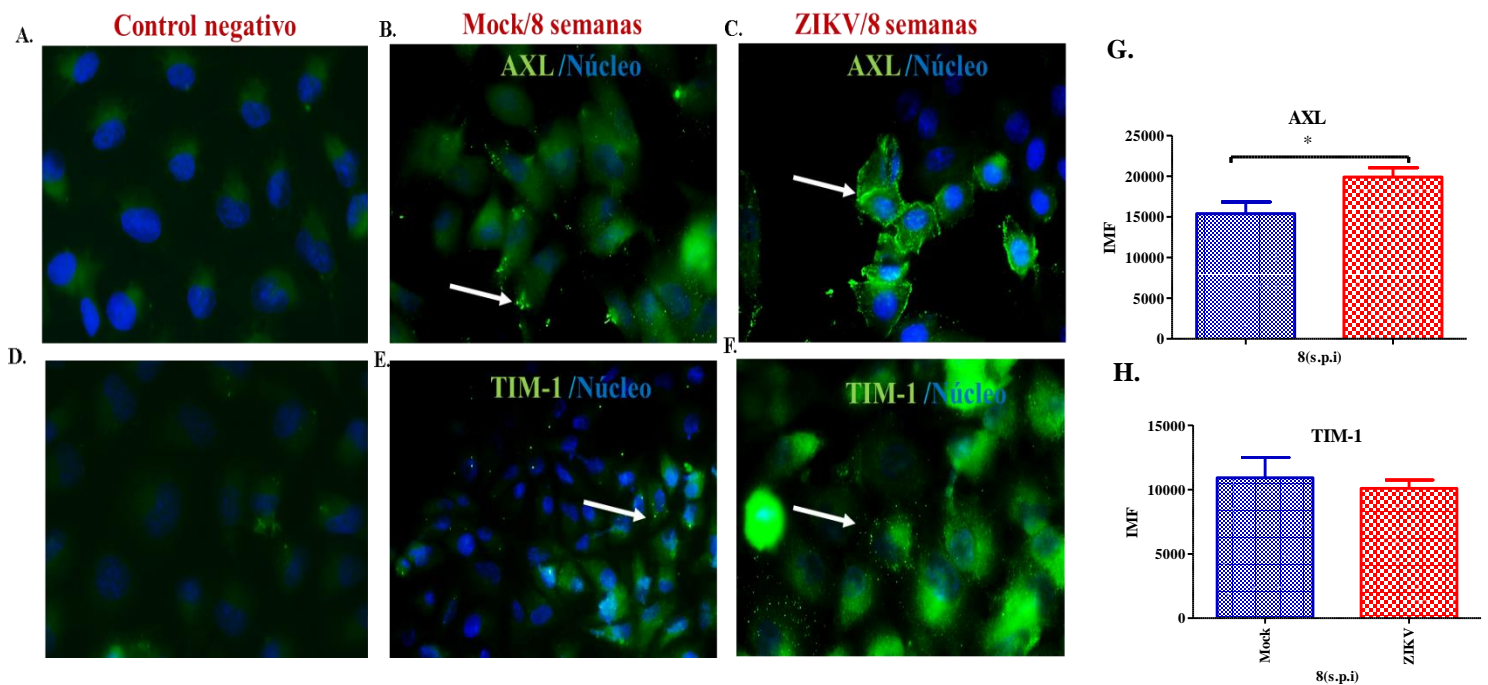


**Figura 9.** La infección persistente del ZIKV modula la respuesta antiviral en los diferentes tiempos de la infección (a- c). La imagen d representa la regulación positiva de la respuesta antiviral desde las 0.14 s.p. i (24 h.p.i). El gráfico e, denota la modulación y/o equilibrios entre la respuesta antiviral y la infección persistente. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (\*): valor de  $p < 0,05$

### 7.3. Hallazgos fenotípicos del cultivo persistente

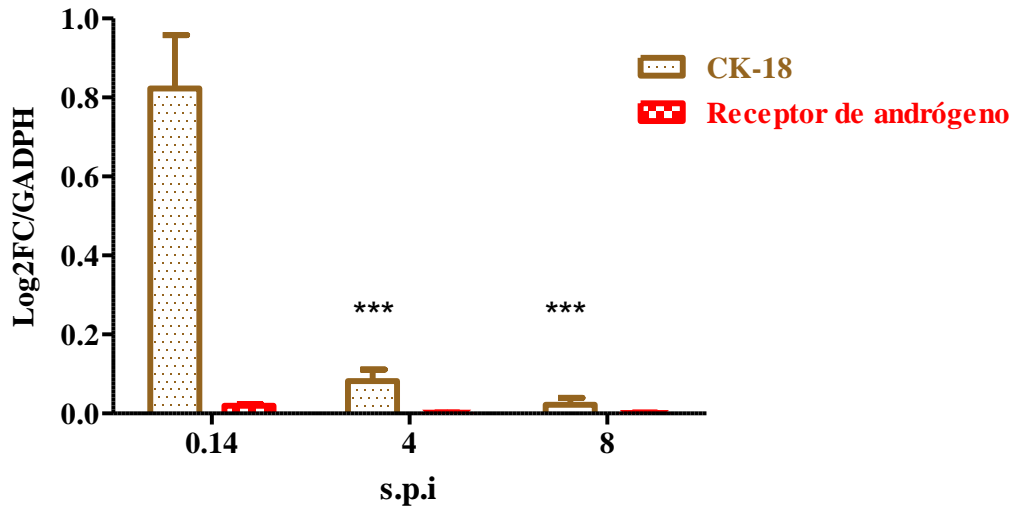
#### 7.3.1 El cultivo persistente expresa los receptores AXL y TIM-1 y presenta alteraciones en los niveles transcripcionales y proteicos de CK-18

Pese a la duración del cultivo persistente, se observó que se mantuvo la expresión y distribución celular de los receptores AXL y TIM-1, importantes para la infección viral (**Fig. 10**). Cabe destacar, que el receptor AXL incrementa significativamente en el cultivo persistente (**Fig.10G**)



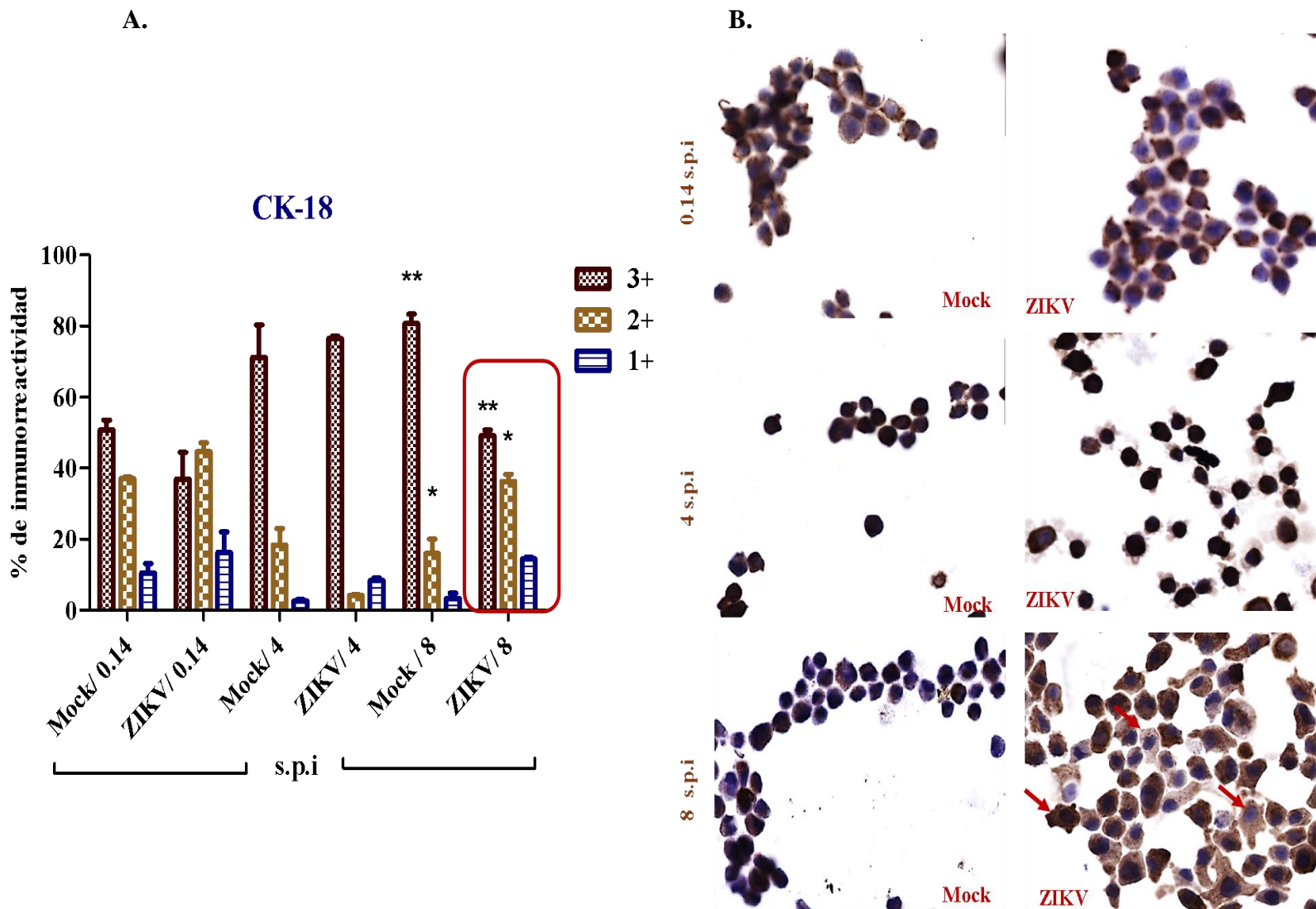
**Figura 10.** Los receptores AXL y TIM-1 permanecen expresados durante la infección persistente en las células PC3. Se observa la expresión del receptor AXL en las células provenientes del cultivo persistente (c) en comparación con las células no infectadas (mock) (b). De la misma manera se evidencia para el receptor TIM-1 (e- f). Los gráficos de barras (g-h) representan los cambios de expresión de los receptores AXL (e) y TIM-1 (f) en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF). Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (\*): valor de  $p < 0,05$ . Las imágenes a y d, representan el control negativo de expresión.

Además, se evidenció que los niveles mRNA del receptor andrógeno se mantuvieron ausentes (**Fig. 11**), lo cual es concordante con la literatura (131).



**Figura 11.** La infección persistente por virus zika disminuye la expresión génica de la citoqueratina 18. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M de tres experimentos independientes realizados por duplicado. La prueba T Student de datos no apareados para determinar la significancia de los datos (\*):  $p < 0.05$ .(\*\*): valor de  $p < 0.01$ .(\*\*\*) valor de  $p < 0.001$ .

Sin embargo, el mRNA de CK-18 (**Fig. 11**) decreció de manera temporal y esto es consistente con la heterogeneidad de la inmunorreactividad en la población celular que fue observada a las 8 s.p.i (**Fig. 12**); donde se obtuvo células con moderada (40%) y baja (~ 10%) reactividad en la proteína CK-18. En la Fig. 11B, se muestra un panel de imagen donde se destaca la variabilidad de expresión de CK18 en las 8 s.p.i con respecto a las células no infectadas (*mock*).



**Figura 12.** La infección persistente por virus zika disminuye la expresión de la citoqueratina 18 (CK-18). La cantidad de CK18 está expresada en porcentajes de inmunoreactividad y se discriminó en :3+ (alta), 2+ (moderada) 1+ (baja) (a). La prueba T Student de datos no apareados para determinar la significancia de los datos (\*):  $p < 0.05$ . En el gráfico b se muestran las imágenes representativas de dicha inmunoreactividad en los diferentes tiempos de la infección persistente comparada con los controles no infectados (*mock*).

### **7.3.2 El ZIKV disminuye la respuesta inflamatoria durante la infección persistente**

Considerando que, (i) algunos agentes infecciosos pueden inducir inflamación crónica por las citoquinas secretadas en el tejido prostático, y que, (ii) en el semen de pacientes infectados con ZIKV, hay presencia de citoquinas inflamatorias en el curso de la infección (28); se

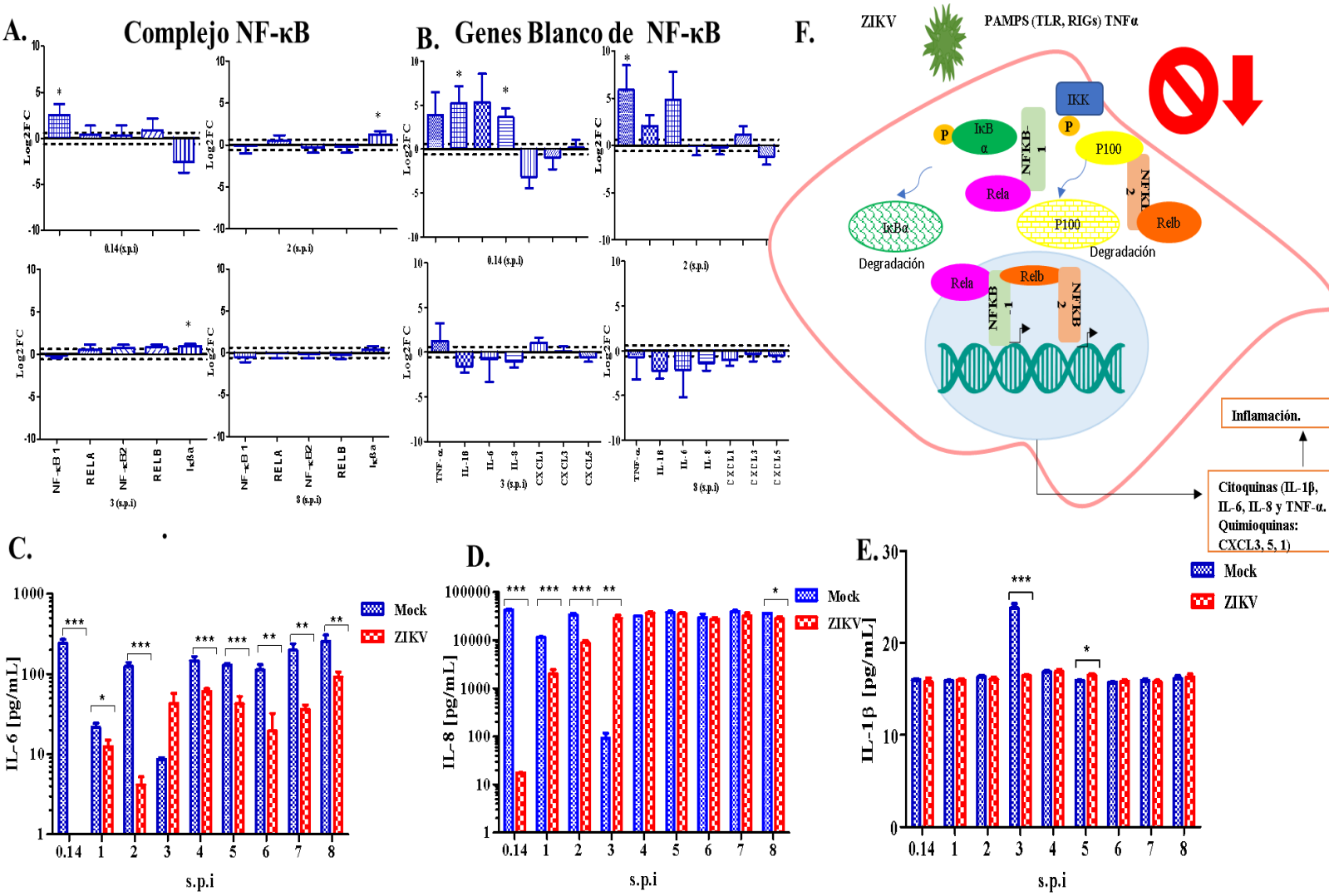
identificó el perfil transcripcional de genes asociados a respuesta inflamatoria, específicamente aquellos pertenecientes a la vía NF- $\kappa$ B (**Fig. 13A**) y sus genes blanco (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL-1 CXCL-3 y CXCL-5) (**Fig. 13B**) y posteriormente, se realizó la validación biológica de algunos marcadores de inflamación en los sobrenadantes obtenidos durante el curso de la infección persistente de ZIKV en células PC3 (**Fig. 13C- E**).

La infección temprana por ZIKV (0.14 s.p.i) regula positiva y significativamente, un componente de la vía de NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B1) y en el límite del umbral se identifican otros genes relacionados (Rel a, NF- $\kappa$ B2, Rel b). Al parecer, este perfil es suficiente para activar la transcripción de los genes blancos de la vía (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8). A partir de las 2 – 8 s.p.i, hay subregulación de la vía NF- $\kappa$ B; sin embargo, se evidencia un *fold change* significativo de TNF- $\alpha$  y tendencias al incremento de IL-1  $\beta$  e IL-6.

En la validación biológica se observó que, en las células PC3 al ser de origen tumoral, secretan algunas citoquinas inflamatorias, tales como: IL-6, IL-8 e IL-1  $\beta$  ya que se detectan en el control sin infección (*Mock*) (**Fig. 13**).

Aunque hay una regulación positiva de los genes de NF- $\kappa$ B durante las 0.14 s.p.i algunas de las citoquinas (IL-6 e IL-8) activadas por este factor de transcripción, se encuentran disminuidas en el sobrenadante del cultivo (**Fig. 13A, B**) y no se muestran diferencias en la concentración de IL-1 $\beta$  (**Fig. 13C**) de células infectadas y no infectadas.

La infección por el ZIKV disminuye la concentración de la IL-6 (**Fig. 13A**) durante el curso de la infección de manera ostensible, a excepción de la semana 3 donde hay una tendencia al incremento de los niveles de dicha interleuquina. (**Fig. 13A**) en los sobrenadantes obtenidos de la infección, es posible que este incremento se deba al descenso del *fitness* viral en la semana 3 (**Fig. 7B**). La IL-8 (**Fig. 13B**) también tienen un comportamiento similar a la IL-6; sin embargo, a partir de la semana 4, su producción es equiparable y constante en los sobrenadantes de células infectadas y no infectadas (**Fig. 13B**). Por su parte, la producción de la IL-1 $\beta$  se mantiene estable, excepto en la semana 3 (**Fig. 13E**). Las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-12p70 e IL-10 no fueron detectadas en células infectadas y no infectadas, durante ninguno de los tiempos evaluados (**datos no mostrados**).



**Figura 13.** La infección persistente por virus zika, disminuye la respuesta inflamatoria en células PC3. Las gráficas muestran el perfil transcripcional de la vía NF-κB (a) y sus genes blancos (b) y las concentraciones en [pg/mL] de las citoquinas IL-6 (c), IL-8 (d), IL-1 β (e). La imagen f representa la vía NF-κB y su activación. Las barras representan la media ± S.E.M de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (\*\*\*): valor de  $p < 0,001$

En vista de las diferencias significativas en la producción de citoquinas en las células infectadas y las no infectadas (**Fig. 13**), se realizó un estudio de correlación entre los marcadores virales (PFUs/mL y RNA de polaridad positiva y negativa) y la producción de citoquinas detectadas en el curso de la infección persistente. Con respecto a esto, se demostró que existe una correlación (0.53,  $p$  valor: 0.0018) entre el patrón de la IL-6 y la producción de RNA viral de polaridad positiva, específicamente con la síntesis de genomas viral de

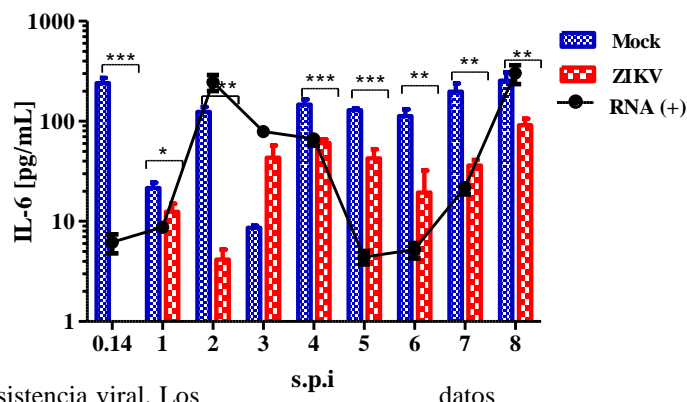


polaridad positiva (**Fig. 14 A, ver recuadro naranja y 14 B**). Las otras interleuquinas analizadas no presentaron una correlación con la persistencia viral.

**A.** **Correlación de la infección por ZIKV y los niveles de la IL-6**

Citoquinas	PFU/mL (p valor)	RNA (+) (p valor)	RNA (-) (p valor)
<b>IL-6</b>	<b>-0.33</b> <b>(0,3110)</b>	<b>0.53*</b> <b>(0,0018)</b>	<b>-0.21</b> <b>(0,2779)</b>
IL-8	-0.14 (0,9594)	-0.13 (0,5604)	0.04 (0,7032)
IL-1 $\beta$	-0.24 (0,4963)	0.04 (0,2230)	0.14 (0,4258)

**B.**



**Figura 14.** Correlación entre las IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 con la persistencia viral. Los datos fueron analizados con el coeficiente de correlación de Pearson.

## 8. DISCUSIÓN

Si bien el virus Zika es un arbovirus transmitido por mosquitos, algunas investigaciones han documentado que el ZIKV se transmite por vía sexual y que puede persistir en semen por un largo periodo, después de la aparición de los síntomas. La presencia de este agente infeccioso en pacientes vasectomizados, es un indicador de que algunos órganos urogenitales, como la próstata, pueden ser nichos de replicación viral (26).

De manera que, el objetivo del presente estudio fue caracterizar la infección del ZIKV en las células PC3, teniendo en cuenta la susceptibilidad, permisividad de la infección y respuesta celular en un periodo de infección temprana, es decir, hasta 120 h.p.i. Asimismo, se estableció un modelo *in vitro* de evaluación de persistencia viral y se determinaron alteraciones celulares y virales a causa de esta infección.

### 8.1 El aislado colombiano del virus Zika (COL345Si) se replica en las células PC3 y modula la respuesta antiviral

La fertilidad masculina requiere de la cooperación de varios órganos del sistema urogenital. A través de sus interacciones, los testículos, el epidídimo y las glándulas accesorias masculinas, como la próstata, contribuyen a la producción del plasma seminal humano (7).



El sistema reproductor masculino es un blanco de infecciones virales, como el ZIKV. Alexander G. Pletnev et al. en 2021 demostraron en ratones AG129 (con inmunodeficiencia) que el epitelio del epidídimo transmite el ZIKV a los 10 d.p.i (etapa temprana de infección), y que el virus era proveniente de los testículos. Además, observaron que otras las células de las glándulas accesorias también participaron en la transmisión viral, aunque, con un menor rendimiento replicativo en comparación con el epidídimo y los testículos (93).

Las glándulas accesorias participan en la secreción de proteínas, factores de crecimiento y otros componentes; cada elemento es necesario para la viabilidad de los espermatozoides y sus procesos biológicos (7). El descubrimiento de RNA del ZIKV en el semen de tres hombres vasectomizados hasta los 69 d.p.i (4,94) plantea que la replicación del ZIKV, puede que se realice, en tejidos urogenitales distintos de los testículos (95).

Considerando que la vasectomía consiste en una resección de los conductos deferentes (96), en la eyaculación de un paciente vasectomizado no debería existir presencia del virus. Por ello, la próstata es un órgano de interés en el estudio de la infección por el virus del Zika. En este trabajo, se eligieron las células PC3 porque a pesar de ser una línea tumoral, tienen la vía de señalización de interferón funcional (15).

Esto permitió conocer la relación entre la respuesta antiviral y la replicación del ZIKV en estas células hasta las 120 h.p.i y con base en estas evidencias, estudiar los elementos asociados a persistencia en un tiempo de infección más prolongado (8 s.p.i, equivalente a 2 meses.)

Teniendo en cuenta que, el aislado colombiano conserva varias de las mutaciones de la cepa pre-epidémicas del linaje asiático MH179341.1, como NS1: A188V, prM: S139N, y la proteína de la envoltura (E): S154N y NS5: M2634V (Fig. 1) (91), se espera que esta historia filogenética contribuya a varios aspectos de la biología del ZIKV que se han investigado en este trabajo.

Entre estos comportamientos fenotípicos que son atribuibles a esas mutaciones, hay un punto a destacar que, tal vez, esté estrechamente implicado con la persistencia de ZIKV en SRM,

como la mutación en la proteína NS1 que disminuye la fosforilación de TBK1 e IRF3 y suprime la inducción de IFN- $\beta$  (97). Por el contrario, las sustituciones en las proteínas PrM (98) y E (99) están relacionadas con la neurovirulencia y, aparentemente, la mutación NS5 no altera la replicación viral (100). Adicionalmente, en este estudio se encontró una mutación en la proteína de la cápside, C: D107E (Fig. S1), en la cepa de estudio MH179341.1; sin embargo, esta sustitución no es relevante, ni afecta el ensamblaje del virus debido a que los aminoácidos que han sido reemplazados tienen propiedades similares (101). Prueba de ello, es la producción eficiente de viriones en los tiempos evaluados (Fig. 5).

Se demostró la expresión de los receptores AXL y TIM-1 en las células PC3 y Vero E6, por lo que se definieron como susceptibles a la infección por ZIKV (Fig. 3). Lo anterior, se verificó por medio de la cinética viral, que se evaluó a las 24-120 h.p.i, observándose que el primer ciclo de replicación finaliza a las 24h, dado a que en este tiempo se recuperó progenie viral. También se observó, síntesis de genomas virales, con una disminución a las 96 h.p.i en los tiempos evaluados (Fig. 5). De tal forma, se concluye que las células PC3 son permisivas a la infección (Fig. 5). Cabe resaltar que, la infección por ZIKV en las células PC3 no alteró la viabilidad a diferencia de lo percibido en las Vero E6 (Fig. S5).

Este resultado motivó a la evaluación del perfil antiviral en varios tiempos (6, 72, 96 y 120 h.p.i), particularmente, donde se halló un mayor o menor rendimiento del genoma viral (Fig. 5). La infección por el ZIKV activó tempranamente la vía del interferón, como se muestra en el *fold change* de mRNA del interferón- $\beta$  y sus genes inducibles (OAS-1, viperina). Cabe señalar que el mRNA de SOCS-1, una molécula supresora de la vía del interferón, se expresa a partir de las 6 h.p.i., esto significa que existe una regulación negativa temprana.

Otras investigaciones muestran un perfil de variabilidad de los IFN (IFN $\alpha$  o IFN $\gamma$ ) y proteínas relacionadas con IFN en las células PNT1A (epitelio de próstata normal) y las células 19I (MSC estromales, derivadas de un donante de próstata sano) infectadas con varias cepas de ZIKV, y los autores aluden a que estas diferencias se deben a modificaciones y cambios fenotípicos en el virus a causa de pases en células humanas y células de insectos (C636) (102). Los informes indican que un número de pases virales entre 10 y 100 pueden afectar la

patogenicidad, la infectividad del virus y su sensibilidad a los tratamientos antivirales (102,103).

En este estudio, se utilizó un aislado de ZIKV de *A. aegypti* de pase n ° 6 (COL345Si), y al compararlo con otras cepas contemporáneas (aislado humano en Colombia-Meta MH544701 y la cepa PRVABC59, aislado de Puerto Rico), se hallaron mínimas variaciones genéticas; la cepa COL345Si tiene una mutación en la proteína de la cápside mencionado anteriormente (Fig. S1). No obstante, el rendimiento viral de la cepa PRVABC59 en las células HUVEC (130) es similar a la cinética que se encontró con el ZIKV-COL345Si en las células PC3; asimismo, se observó que ambas cepas virales activan la respuesta de interferón tipo I.

Es relevante mencionar que la respuesta antiviral depende del tipo de interacción virus-célula. En células de Hofbauer infectadas con ZIKV/PRVABC59 (104), la respuesta antiviral reduce la replicación viral, pero en esta investigación se notó que dicha respuesta no es suficiente para eliminar la infección por ZIKV en las células PC3. La presencia del receptor AXL en las células PC3 podría explicar el comportamiento de la respuesta inmune. Se ha descrito que, la unión de los receptores AXL e interferón, activan a la Janus quinasa 1 (JAK1) por medio de la fosforilación; este último fosforila el factor de transcripción STAT1 que se transloca al núcleo y promueve las síntesis de transcritos de SOCS-1 (13).

Recientes reportes han identificado a AXL como un factor potencial de entrada de ZIKV y un posible regulador de la respuesta antiviral. Cuando se inhibe la acción quinasa de AXL, no se detectó una disminución significativa de la tasa de entrada del virus ZIKV, sin embargo, se observó una disminución en la expresión de SOCS- 1 y 3 con incremento en la expresión de los genes estimulados por interferón, de manera que hubo una disminución en la tasa de replicación del virus ZIKV (14). Estos datos demuestran que AXL promueve la entrada de ZIKV y regula negativamente el estado antiviral de las células de Sertoli para aumentar la infección de ZIKV en los testículos; esto proporciona conocimientos sobre la inmunidad antiviral de los testículos y la posible persistencia del ZIKV (14).

La modulación de la infección por ZIKV a través de SOCS-1 también fue comprobada en las células A549, JAr y hNPC por la síntesis de transcritos mRNA y expresión proteica de SOCS-1 y SOCS-3 (105) y al igual que en este estudio, la expresión de estos genes fue

detectada en las primeras horas de la infección. Estos datos insinúan que, la expresión de mRNA se correlaciona con la expresión de la proteína (105).

La síntesis del genoma viral tiene una producción constante hasta 72 h.p.i. y decrece a las 96 h.p.i. Lo anterior propone que, los niveles de SOCS-1 hallados durante las 96 h.p.i, no son significativos para inhibir la respuesta antiviral (**Fig. 6A**). Esto coincide con otras investigaciones, que demuestran que las células prostáticas (LNCaP) infectadas con ZIKV no variabilidad en la replicación de sus genomas debido a la ausencia de la respuesta del interferón (106). Por otro lado, las células madre mesenquimales prostáticas humanas (MSCs) tienen la vía señalización funcional del interferón y, por consiguiente, existe una variabilidad de replicación de cepas de ZIKV (106).

De acuerdo con otros estudios que se realizaron en células endoteliales microvasculares de cerebro humano (hBMEC) infectadas con ZIKV, los ISGs se detectaron hasta 9 d.p.i; sin embargo, hubo variaciones en los perfiles de los interferones tipo I de hasta 2 d.p.i. Aparentemente los mecanismos de regulación de la respuesta antiviral son diferentes a los observados en esta investigación (107). Los autores infieren que, la ausencia de un efecto citopático (CPE) se debe a la inducción de genes pro-supervivencia durante la infección por ZIKV de hBMEC, incluidos EGR1, ATF3 y BIRC3 (107). En este estudio, no se evaluaron las moléculas de supervivencia mencionadas, pero no se puede descartar que estas sean las responsables de la ausencia de dicho efecto hasta las 120 h.p.i.

Se propone que, AXL ejerce un control sobre la respuesta antiviral en una infección por ZIKV, ya que cuando las células se infectan a una MOI elevada (MOI = 3), la expresión del receptor aumenta, a diferencia de TIM-1, por lo que este último solo tiene un papel en la entrada viral.

Teniendo en cuenta lo anterior, se plantea la importancia del *cross-talk* entre AXL y la señalización del interferón tipo I para modular el estado antiviral y la replicación del ZIKV hasta las 120 h.p.i. Es importante mencionar que las cepas africanas y asiáticas tienen diferencias en sus tasas de replicación *in vitro* en diferentes células de mamíferos e insectos (2,108). El linaje africano se replica más rápido, a diferencia del linaje asiático, provocando la muerte celular (104). Esto es coherente con lo obtenido en este trabajo, pues en las células PC3 infectadas con ZIKV/Dakar (linaje africano), se observó un CPE entre los 5 a 10 d.p.i. (**Fig. S5**). Estos resultados son similares a otros hallazgos que demostraron que ciertas líneas

celulares son diferencialmente susceptibles a las infecciones por ZIKV/Uganda (africano) y ZIKV/PRVABC59 (asiático-estadounidense), donde los autores encontraron el LNCaP (próstata) y las líneas celulares 833KE (testículo) fueron permisivas a la infección sin inducción de CPE (108). Por tanto, las diferencias entre las cinéticas virales de las células Vero E6 y PC3, así como los resultados adicionales que se obtuvieron con la cepa Dakar permitieron hipotetizar la posible persistencia de la infección por la cepa ZIKV-COL345Si en las células prostáticas. Por esta razón, se realizaron pruebas de cultivo *in vitro* durante tiempos prolongados de infección (8 s.p.i) para identificar la regulación de los genes celulares y virales implicados en este fenómeno.

## **8.2 El aislado colombiano del virus Zika (COL345Si) establece infección persistente en las células PC3 obteniendo cambios en sus proteínas estructurales (PrM y E) y no estructurales (NS1) y regulando la expresión transcripcional de genes relacionados con la autofagia y respuesta a interferón.**

Las dinámicas de infección en las células PC3 con el linaje de ZIKV africano/ Dakar, el aislado de ZIKV/COL345Si (Linaje asiático/americano) (Fig. **S6, S7**) y los serotipos de DENV 1- 4 (Fig. **S6, S7**), demostraron que, el ZIKV/COL345Si establece infección persistente en dichas células hasta las 8 s.p.i; lo anterior fue evidenciado por la presencia de diferentes elementos virales (**Fig. 7B**) y por la carencia de efecto citopático (**Fig. 7A**). Estos rasgos insinúan, que el ZIKV puede persistir en reservorios celulares donde se admita un balance entre la supervivencia de la célula, su replicación y posiblemente la evasión de la respuesta inmune innata. La permanencia del ZIKV en las células PC3, probablemente, facilite la capacidad de este virus para transmitirse sexualmente a la madre gestante (104) y de esta forma, acceder al tejido neuronal del feto donde se generan las manifestaciones más severas de la infección.

La persistencia del virus en células de próstata no tumorales, RWPE-1, también ha sido reportada por Izuagbe R L et al 2019 (109). Los autores, demostraron que una cepa contemporánea de Brasil (BeH815744) de ZIKV y pre- epidémica (H/PF/2013) puede persistir con diferentes con multiplicidades de infección (MOI=10) y (MOI=1), hasta los 30 d.p.i con síntesis constante de genomas, viriones y ausencia de efecto citopático. Cabe

resaltar que, al igual que en este trabajo, el mayor rendimiento de progenie viral es hasta los 15 d.p.i (109).

La congruencia de ambos hallazgos, muestran enfáticamente el tropismo, la replicación del genoma y persistencia viral en la glándula prostática, siendo esta un órgano inmunocompetente.

Los patógenos virales, han evolucionado exitosamente para evadir respuestas celulares que impidan su ciclo infección, pero también para redireccionar vías de señalización del hospedero que promuevan su replicación y transmisión. Durante la infección persistente de ZIKV, se encontraron variaciones genéticas del ZIKV (además de las previamente reportadas y que tienen un rol en la patogénesis), se resaltan aquellas observadas en las proteínas estructurales. Por su parte, la proteína de E tuvo cambio en dos posiciones: (i) E683K, que constituye al dominio III; el cual tiene importancia en la unión a receptor y (ii) T760M que corresponde al dominio de transmembrana (TMD) (9, 110). El cambio identificado en prM (H205R) también tiene lugar en el TMD (110). Aún no se conoce sobre el alcance de las mutaciones en dichas proteínas; sin embargo, estos sitios corresponden a dominios de transmembrana de E y PrM, que, según lo reportado, tiene significancia en el anclaje de dichas proteínas al retículo endoplasmático para el ensamblaje y adecuada maduración del virus. En DENV (110) y YFV (111) se ha observado que, cambios en estos sitios influyen en la longitud del dominio y, en consecuencia, se generan una mayor producción de partículas similares a virus (VLP), lo que sugiere que las modificaciones de TMD facilitan la producción de VLP. En vista que, las VLPs no son infecciosos, es posible que estos cambios revelados no afecten, de manera significativa, la maduración e infectividad de la partícula viral dado a su progenie cuantificada en el curso de la infección (**Fig. 7B**). Sin embargo, no se debe desechar la posibilidad de que estos cambios en las proteínas estructurales tengan un impacto en el tropismo o en mecanismos de diseminación diferentes (*spreading- cell to - cell*).

Por otro lado, se identificó una mutación en una proteína no estructural, NS1(R897T), el cual se desconoce el efecto de dicha mutación en las funciones de esta proteína a nivel del ciclo viral (replicación viral) y actividad antiviral; sin embargo, la proteína NS1 es uno de los

determinantes virales, dado a que inhibe la vía antiviral por diferentes estrategias: interacción con RIG-I (112), inhibición de TBK-1 (97) y los TLR 3 y a su vez, activa el inflamosoma.

La permanencia de la replicación viral en las células PC3 es favorecida por la posible interacción y regulación transcripcional de genes asociados a dos vías de señalización: autofagia y respuesta inmune innata. Por su parte, la autofagia puede ser activada por acción directa del virus, es decir, la proteína NS4A (57), pero también, por estrés de retículo endoplasmático (ER) debido a la producción excesiva de proteínas virales. En este evento, sensores de estrés como PERK, IRE-1 y ATF6 (60, 61) activan factores de transcripción que inducen la expresión de proteínas de choque térmico (GRP94 que su función es plegar proteínas), ERAD (HRD1 y HERPUDs), metabolismo de lípidos y autofagia (61). Lo anterior, tiene como finalidad mantener el equilibrio y funcionalidad del ER. En este sentido, se indagó si el cultivo persistente presentaba regulación en estrés de ER y en efecto, los genes relacionados, presentan regulación positiva a las 0.14 y 2 s.p.i (Fig. S9). siendo más evidente en el tiempo temprano (Fig. S9), pues a las 2 s.p.i hay una tendencia de sobre-regulación de algunos genes que se observan en el límite del umbral del *fold change* ~ 0.6 (Fig. S9); por tanto, es viable que estas regulaciones sean suficientes para activar la autofagia. Algunos virus como HCV (familia *Flaviviridae*), que establece infección crónica, promueve estrés de ER, evidenciado por la presencia de marcadores de estrés en pacientes con HCV crónica (mRNA GRp94, CHOP y GADD34) (60, 61) que, potencialmente, se correlaciona con otros estudios donde la cronicidad de dicho virus causa autofagia según la detección de dos marcadores de autofagia: LC3 y LC3II en biopsia de hígado (62).

Teniendo en cuenta la dinámica de replicación viral, la autofagia es una vía regulada positivamente en los tiempos donde inicia el ascenso de progenie viral, es decir, a las 0.14 - 2 s.p.i. Resaltando que, la regulación más importante es sobre los genes asociados a la formación del autofagosoma, con lo cual se sugiere que, esta estructura es una plataforma eficiente de replicación (demostrado por la síntesis de genomas virales a las 2 s.p.i) y/o liberación viral, al igual como ocurre en otros flavivirus (DENV) (55). Tal vez, la inhibición en la etapa de fusión del autofagolisosoma y degradación, es un mecanismo del virus para evitar su eliminación por esta vía (xenofagia) (54). Una vez que decaen los viriones a las 3 y 8 s.p.i, el proceso se sub-regula en todas sus etapas. Este hallazgo, coincide con los tiempos

donde hay la regulación positiva de estrés de ER (Fig. S9); con lo cual, se podría considerar que dicho estrés es un inductor de autofagia en este modelo de persistencia *in vitro*.

En virus que establecen persistencia, como el VIH, la autofagia contribuye en la biogénesis viral, a través del procesamiento de la proteína Gag- precursora de la envoltura viral (113) y, además, la liberación del virus es estimulada por la maquinaria de la autofagia. De manera similar, se requieren de algunas proteínas de la autofagia para la salida de poliovirus (114). Otra función proviral de esta vía de señalización, es su participación en la replicación y traducción del RNA de HCV mediante las siguientes proteínas: beclina, ATG4B, ATG5, ATG7 y ATG12 (115). Del mismo modo, HBV, un virus DNA, también utiliza este proceso biológico para mejorar la replicación del genoma viral (116).

Una manera de enlazar la autofagia con la replicación viral, es por su posible rol en la remodelación del RE que mejora dicho proceso (60) o también la fusión de los autofagosomas a los cuerpos multivesiculares que favorecen a la salida del virus (117).

Ciertamente, la respuesta inmune innata estuvo regulada positivamente en los tiempos supervisados; así lo señala el perfil transcripcional de los interferones tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) y III ( $\lambda$ ) y la vía JAK/STAT y los ISGs. La regulación negativa de la respuesta a interferón, es posible por el incremento significativo de SOCS-1 (38) a las 0.14 s.p.i. Sin embargo, donde hay mayor rendimiento viral (2 s.p.i) los componentes de JAK/STAT disminuyen, pero con *fold change* significativo de USP18, otro inhibidor del IFN. Durante la semana 3 hay un restablecimiento de todos los constituyentes de la vía JAK/STAT, que coincide con la significancia de los ISGs. Esto explica, la disminución en los títulos virales durante esta ventana temporal. Aun cuando cambia el comportamiento transcripcional de la vía en mención en la semana 8, se puede observar un grado de activación. Una manera de argumentar lo anterior, es mediante la dinámica viral a las 8 s.p.i, pues en comparación con las 3 s.p.i, los títulos virales se mantienen superiores. Por lo tanto, no hay un control equiparable de la infección (**Fig. 9**).

No se puede descartar que, durante la persistencia, de ZIKV en las células PC3, se genere interacción de diferentes rutas celulares que benefician la permanencia de la infección. Ke, P.Y. y Chen, S.S. 2011 demostraron que, HCV activa autofagia e inhibe la respuesta inmune



innata mediante el *knockdown* de ATG5 o inhibición de la actividad lisosomal, empleando cloroquina (118). Esto conllevó a la activación de la señalización del IFN vía RIG-I (**PRRs**) y producción de IFN I (118). De la misma manera, Jounai et al 2007 encontraron que el complejo de autofagia (ATG5- ATG12, que participa en la formación del autofagosoma) interactúa con RIG-I y la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), un efector de RIG-I, para inhibir la transducción de señales y la inducción de tipo IFN I (119). De igual modo, otros investigadores inhibieron componentes de la vía (Beclin-1 o ATG7) en células infectadas con HCV (64) y observaron el mismo comportamiento mencionado anteriormente.

### **8.3 La infección persistente del ZIKV COL345Si causa cambios en la expresión de CK-18 y del receptor AXL.**

En vista de que, la patogénesis viral integra una serie de sucesos que convergen para causar un trastorno o enfermedad, se pretendió identificar algunos cambios fenotípicos que pueden ser consecuencia de la persistencia de ZIKV en este tipo celular.

En el numeral **8.1** se discute sobre la -plausible- relevancia del receptor AXL durante la infección temprana del ZIKV (24 h.p.i y a las 120 h.p.i) y su papel modulador con la respuesta al IFN. Por tal razón, se examinó su estado en las etapas tardías y se notó que, mantiene su ubicación subcelular, pero incrementa la expresión a las 8 s.p.i. El RNAseq demostró que este receptor se regula positivamente a las 2 y 3 s.p.i (Fig. **S10**), esto concuerda con la presencia del inhibidor SOCS-1 en dichos tiempos, a las 8 s.p.i regulación negativa de AXL no afectó el incremento de su expresión. Por lo tanto, se postula su importancia en la regulación de la respuesta inmune y en la persistencia. Para el caso de TIM-1, aparentemente, no tiene cambios transcripcionales, ni en la expresión en los tiempos tardíos (Fig. **S10**). Si se observó un *fold change* significativo a las 0.14 s.p.i pero sin cambios sustanciales en la expresión de proteína.

Las citoqueratinas (CKs) son un tipo de filamentos intermedios del citoesqueleto que se expresan ampliamente en varios epitelios de manera diferencial (8); lo cual es útil para discriminar aquellos epitelios simples de los complejos (8). Asimismo, el patrón de expresión de dichos filamentos sirve como marcador de diferenciación celular en un mismo tejido; este es el caso, de las células luminales y basales que conforman el epitelio prostático. Sin

embargo, en un contexto patológico, tal como las neoplasias malignas o benignas el perfil de expresión de las CKs puede verse afectado (8).

El epitelio prostático adulto consiste en un compartimento basal, secretor y células neuroendocrinas (NE). En el basal, la mayoría de las células basales expresan p63, CK5 y CK14 (8) y en el secretor consta de una capa luminal de células columnares altas que presentan marcadores como el receptor de andrógenos (AR), CK 8, y 18 y el antígeno prostático (PSA); por su parte, las células neuroendocrinas prostáticas que expresan cromogranina A (8).

En esta ocasión, las células PC3 infectadas persistentemente con ZIKV (8 s.p.i) presentan disminución de la expresión de mRNA de CK-18 y heterogeneidad en el marcador de CK-18 en las poblaciones celulares (alta, moderada y baja), lo que indica un cambio en el fenotipo de la célula (Fig. 12), puesto que se reduce la frecuencia de inmunorreacción alta, se aumenta la población celular con inmunorreactividad moderada y las células con baja expresión tienen tendencia al incremento. Considerando que, la célula es de origen tumoral, no se puede asegurar que este hallazgo esté relacionado con una posible disfuncionalidad de la actividad secretora del compartimento; debido a que las CKs pueden tener una expresión aberrante en diversos tumores (120). Aunque, existen estudios de tejidos que demuestran que no hay diferencias entre la expresión de CK18 en pacientes sanos, con hiperplasia o con cáncer (121). Por ello, es necesario a futuro comparar este perfil de expresión con una célula prostática no tumoral.

La pérdida de dicho marcador en tejido prostático sano, ha sido reportada en ratones infectados con ZIKV hasta 21 d.p.i (5) y el fenómeno fue sujeto a la respuesta inflamatoria en este tejido (5).

#### **8.4 La persistencia de ZIKV en las células PC3 modula la respuesta inflamatoria**

La inflamación es la respuesta que se genera con el fin de aclarar la infección; sin embargo, un excesivo estímulo inflamatorio causa daño celular o tisular (66, 67).

Teniendo en cuenta esta premisa, los virus deben consolidar estrategias que regulen dicho proceso y así, garantizar su transmisión.

Las células PC3 al ser de origen tumoral se caracterizan por tener un ambiente inflamatorio. De hecho, el incremento de IL-6 en pacientes con cáncer prostático, es un marcador de progresión debido a que está implicada en neovascularización, proliferación celular y activación de vías de supervivencia celular (122, 123). Lo anterior, es consistente con lo hallado en las células PC3 no infectadas (*mock*), pues producen altas concentraciones de IL-6 (**Fig. 13C**). En cambio, las células PC3 infectadas con ZIKV regulan el ambiente inflamatorio disminuyendo transcripcionalmente la vía NF $\kappa$ -B, implicada en inflamación, y sus genes blancos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL3 y CXCL5) (124) durante los tiempos tardíos de la infección (**Fig. 13 A, B**). Durante las 0.14 s.p.i, se observa una activación transcripcional de la vía NF $\kappa$ -B (**Fig. 13 A, B**). Esto, no se compara con las 2 semanas, donde la vía está subregulada, aunque se detecta el mRNA de algunos blancos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y CXCL3).

La validación biológica de los anteriores rasgos de transcripción de la respuesta inflamatoria, se realizó por la medición de algunas citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) y distintivamente, se obtuvo que las concentraciones de IL-6 disminuyen significativamente durante toda la infección con tendencia al incremento a las 3 semanas, que converge con el descenso del rendimiento viral, activación de la respuesta inmune innata y regulación negativa de la autofagia. La IL-8 tuvo un comportamiento similar; no obstante, se detectaron concentraciones estables tanto en el *mock* y células infectadas hasta las 7 s.p.i.

Por otra parte, la IL-1 $\beta$ , posiblemente, tiene un comportamiento distinto, es estable hasta las 2 s.p.i y disminuye su concentración a las 3 s.p.i y luego, hay leve incremento a las 5 s.p.i, en el cual se restablece el rendimiento del virus. Lo que sugiere que, el dinamismo de esta citoquina inflamatoria durante la infección está regulado por una vía diferente a NF $\kappa$ -B. Por lo tanto, se podría plantear que el inflamosoma (125), quizás, es un blanco modulado durante la persistencia, debido a que este tiene como función la maduración de la IL-1 $\beta$  (126).

Teniendo en cuenta el patrón de secreción de la IL-6, es afectada negativamente durante la persistencia del virus. Por tal motivo, se evaluó si existe una correlación entre los componentes virales (RNA viral (+), RNA viral (-) y PFUs) y la IL-6. En ese sentido, se estableció que hay una relación moderada entre la infección y la IL-6, específicamente con el RNA viral de polaridad positiva (+) (**Fig. 14**). Lo anterior sugiere que, tal vez, el RNA

viral + está ejerciendo una función regulatoria en el entorno inflamatorio de la célula tumoral PC3 mediante su unión a RIG-I y a MDA5, pues se conoce que estos sensores virales reconocen el extremo 5'-(P)PP de los RNA virales para activar respuestas inflamatorias vía NFκ-B (127) y la transcripción y producción de IFN I (α, β, entre otros.) y III (λ) (128) que en esta investigación se encuentra regulados positivamente en la persistencia viral.

Los datos en conjunto muestran dos visiones: (i) la célula debe activar aquellos elementos del sistema inmune innato que ayudan a controlar la infección y paralelamente, (ii) el ZIKV estimula rutas celulares como la autofagia que favorecen su ciclo replicativo y a su vez, limita la activación descontrolada de la respuesta inmune e inflamación. De manera que el virus encuentra el entorno ideal para replicarse y persistir.

Este estudio, integra diferentes aristas del panorama transcripcional de un cultivo persistente. En ese sentido, no se podría exceptuar que los perfiles de los genes de las vías reguladas (autofagia, respuesta a interferón e inflamación) se deban a un mecanismo de *non-coding* RNA que se inducen por la infección y tienen una implicación fundamental la modulación de la interacción virus-hospedero (128).

## 10. CONCLUSIONES

- Las células PC3 son susceptibles y permisivas a la infección por ZIKV mediante la modulación de la respuesta a interferón I.
- El virus ZIKV establece una infección persistente en las células PC3, así lo confirmó el esquema experimental que se realizó con algunos virus que ejercen una infección aguda; tales como los serotipos de DENV y el linaje africano de ZIKV, altamente citopático.
- La alta tasa de mutación de los virus RNA como el ZIKV, probablemente, promueve la persistencia de dicho virus. Así lo evidencia las mutaciones encontradas en las proteínas de: **E, PrM y NS1.**
- Durante la infección persistente en las células PC3 se regulan el perfil transcripcional de genes asociados a vías de autofagia, respuesta inmune innata e inflamación. Sin

embargo, en el caso de autofagia y respuesta inmune requieren ser validados biológicamente.

La persistencia de ZIKV causa cambios en la expresión de la proteína CK-18 que es importante para el funcionamiento de la próstata y además de ello, ZIKV regula el entorno inflamatorio de las células PC3, evidenciado principalmente con el comportamiento de genes de la ruta NF- $\kappa$ B y las concentraciones de la IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Evaluar la expresión proteica de los marcadores de autofagia regulados positiva y negativamente durante la persistencia viral.
- Evaluar la respuesta antiviral mediante la detección proteína de IFN y sus ISGs.
- Examinar mecanismos de *non-coding* RNA como regulación transcripcional.

## **11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Musso, D.; Gubler, D.J. Virus Zika. Clin. Microbiol. Rev. 2016, 29, 487–524.

2. Beaver, J.T.; Lelutiu, N.; Habib, R.; Skountzou, I. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front. Immunol.* 2018, 9, 1640.
3. Miner, J.J.; Diamond, M.S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* 2017, 21, 134–142
4. Kurscheidt, F.A.; Mesquita, C.S.S.; Damke, G.M.Z.F.; Damke, E.; Carvalho, A.R.B.D.A.; Suehiro, T.T.; Teixeira, J.J.V.; da Silva, V.R.S.; Souza, R.P.; Consolaro, M.E.L. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nat. Rev. Urol.* 2019, 16, 211–230.
5. Halabi, J.; Jagger, B.W.; Salazar, V.; Winkler, E.S.; White, J.P.; Humphrey, P.A.; Hirsch, A.J.; Streblow, D.N.; Diamond, M.S.; Moley, K. Zika Virus Causes Acute and Chronic Prostatitis in Mice and Macaques. *J. Infect. Dis.* 2020, 221, 1506–1517
6. Berry, N.; Ferguson, D.; Ham, C.; Hall, J.; Jenkins, A.; Giles, E.; Devshi, D.; Kempster, S.; Rose, N.; Dowall, S.; et al. High susceptibility, viral dynamics and persistence of South American Zika virus in New World monkey species. *Sci. Rep.* 2019, 9, 14495.
7. Verze, P.; Cai, T.; Lorenzetti, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat. Rev. Urol.* 2016, 13, 379–386.
8. Y Wang, S Hayward, M Cao, K Thayer, G Cunha. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation.* 2001, 68:270–279
9. Che B.; Zhang W.; Xu Shenghan., Yin J. and et al. Prostate Microbiota and Prostate Cancer: A New Trend in Treatment. *Front Oncol.* 2021
10. The Human Protein Atlas. Available online: <https://www.proteinatlas.org/> (accessed on 27 August 2022)
11. Pan, Y.; Cai, W.; Cheng, A.; Wang, M.; Yin, Z.; Jia, R. Flaviviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Front. Immunol.* 2022, 13, 829433
12. Ngonu, A.E.; Shresta, S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu. Rev. Immunol.* 2018, 36, 279–308.

13. Lemke, G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013, 5, a009076.
14. Strange, D.P.; Jiyarom, B.; Pourhabibi Zarandi, N.; Xie, X.; Baker, C.; Sadri-Ardekani, H.; Shi, P.-Y.; Verma, S. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *mBio* 2019, 10, e01372-19.
15. Carey, B.L.; Ahmed, M.; Puckett, S.; Lyles, D.S. Early steps of the virus replication cycle are inhibited in prostate cancer cells resistant to oncolytic vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 2008, 82, 12104–12115.
16. Górski A.; Jończyk-Matysiak E.; Łusiak-Szelachowska M. Phage Therapy in Prostatitis: Recent Prospects. *Front Microbiol.* 2018, 29; 9:1434.
17. Young PR, Ng LFP, Hall RA, Smith DW, Johansen CA. Arbovirus infections. En : 23rd edn. Amsterdam: Manson's tropical diseases, Elsevier; 2014. p. 129–161.
18. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol.* 2018; 9:2180.
19. ktepe TE, Mackenzie JM. Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous! *Cell Microbiol.* 2018;20(8): e12884.
20. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of Assembly: roles of Flaviviridae nonstructural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(9):699–708.
21. Chong H; Yee Leow C.; Abdul Majeed A B.; Heng Leow C. Flavivirus infection-A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Res.* 2019 Dec; 274:197770

22. . McCormick KD.; Liu S.; Jacobs JL and et al. Development of a Robust Cytopathic Effect-Based High-Throughput Screening Assay to Identify Novel Inhibitors of Dengue Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012
23. Monika Soni.; Siraj A. Khan.; K. Bhattacharjee C and Dutta P. Experimental study of dengue virus infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A comparative analysis on susceptibility, virus transmission and reproductive success. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2020
24. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*. 2016; 130: 69-80.
25. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddock AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(5):880-2.
26. Stassen L, Armitage CW, van der Heide DJ, Beagley KW, Frentiu FD. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. *Viruses*. 2018; 10(4).
27. S.J Flint.; LW Enquist and VR Racaniello. *Principles of virology - 3th Edition*1994. 6 p (2)
28. Oliveira D B. L.; Durigon G S and et al. Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. *Viruses*.2018
29. Nadia Prisant and et al. Zika virus in the female genital tract. *Lancet infectious diseases*. 2016



30. Inbal Benhar, Anat London, and Michal Schwartz. The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. *Front Immunol.* 2012; 3: 296.
31. Arévalo Romero et al. The Dual Role of the Immune Response in Reproductive Organs During Zika Virus Infection. *Front Immunol.* 2017
32. Motrich R D.; Salazar Florencia C and Breser ML. Implications of prostate inflammation on male fertility. *Andrologia.* 2018
33. Liu, Z.Y.; Shi, W.F.; Qin, C.F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019, 17, 131–139
34. McCarthy M K. and Morrison T E. Persistent RNA virus infections: do PAMPS drive chronic disease? *Curr Opin Virol.* 2017 Apr; 23: 8–15.
35. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* 1997; 51:151–78.
36. Domingo E, Baranowski E.; Nuñez JI, Ruiz-Jarabo CM, Sierra S.; Molina N, et al. Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2000;19(1):55–63.
37. Freire Vitiello GA.; Silva Ferreira WA.; Cordeiro de Lima V C and et al. Antiviral Responses in Cancer: Boosting Antitumor Immunity Through Activation of Interferon Pathway in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2021; 12: 782852.
38. Schneider W M.; Chevillotte M D and Rice C M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses *Annu Rev Immunol* 2014; 32:513-45

39. Valdés López J F.; Velilla P A and Urcuqui-Inchima S. Chikungunya Virus and Zika Virus, Two Different Viruses Examined with a Common Aim: Role of Pattern Recognition Receptors on the Inflammatory Response. *Journal of interferon & cytokine research*. 2019
40. Okamoto T.; Suzuki T.; Kusakabe S.; Tokunaga M and et al. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* 2017, 9(9), 243
41. Ghosh Roy S.; Sadigh.; Datan E. and et al. Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. *World J Biol Chem*. 2014
42. McLean J.; Wudzinska A.; Datan E and et al. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem*. 2011
43. Lee, C.J.; Liao C.L.; Lin Y.L. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *J. Virol*. 2005, 79, 8388–8399
44. Urbanowski, M.D.; Hobman, T.C. The West Nile virus capsid protein blocks apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J. Virol*. 2012, 87, 872–881.
45. Turpin J., Frumence E., Desprès P., Viranaicken W., Krejbich-Trotot P. The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Cells*. 2019; 8:1338.
46. C L Liao; Y L Lin.; S C Shen and et al. Antiapoptotic but not antiviral function of human bcl-2 assists establishment of Japanese encephalitis virus persistence in cultured cells. *J Virol*. 1998
47. Mothes W.; M. Sherer N.; Jin J and Zhong P. Virus Cell-to-Cell Transmission. *Journal of Virology*. 2010

48. Di Lorenzo C.; N. Angus A G and. Patel AH. Hepatitis C Virus Evasion Mechanisms from Neutralizing Antibodies. *Viruses*. 2011
49. Carmichael J C. ; Yokota H. Craven R and et al. The HSV-1 mechanisms of cell-to-cell spread and fusion are critically dependent on host PTP1B. *PLoS Pathog*. 2018
50. Gupta, P., R. Balachandran, M. Ho, A. Enrico, and C. Rinaldo. 1989. Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody. *J. Virol*. 1989
51. Yang C-F.; Tu C-H.; Lo Y-P and et al. Involvement of Tetraspanin C189 in Cell-to-Cell Spreading of the Dengue Virus in C6/36 Cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015
52. Clark A E.; Zhu Z.; Krach F.; Rich J N and et al. Zika virus is transmitted in neural progenitor cells via cell-to-cell spread and infection is inhibited by the autophagy inducer trehalose *J Virol*. 2021
53. Tristan X. Jordan and Randall G. Flaviviruses and autophagy *Autophagy, Infection, and the Immune Response*, First Edition. 2012
54. Mao K and Klionsky D J. Xenophagy: A battlefield between host and microbe, and a possible avenue for cancer treatment *Autophagy*. 2017
55. Nidhi Chaudhary, Shikha Srivastava, Sunny Gupta, Manoj B. Menon, Ashok Kumar Patel. Dengue virus-induced autophagy is mediated by HMGB1 and promotes viral propagation *International Journal of Biological Macromolecules*.2023
56. Cao B, et al. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J Exp Med*. 2017;214(8):2303–2313.

57. Liang Q, et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):663–671.
58. Wang J., Kang R., Huang H., Xi X., Wang B., Zhao Z. Hepatitis C virus core protein activates autophagy through EIF2AK3 and ATF6 UPR pathway-mediated MAP1LC3B and ATG12 expression. *Autophagy*. 2014
59. Ellgaard L., Helenius A. Quality controls in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4:181–191.
60. Dash S.; Chava S.; Aydin Yucel and et al. Hepatitis C Virus Infection Induces Autophagy as a Prosurvival Mechanism to Alleviate Hepatic ER-Stress Response. *Viruses*. 2016
61. W Linya and James Ou J-h. Hepatitis C Virus and Autophagy. *Biol Chem*. 2015
62. Rautou, P.E.; Cazals-Hatem, D.; Feldmann, G.; Mansouri, A.; Grodet, A.; Barge, S.; Martinot-Peignoux, M.; Duces, A.; Bieche, I.; Lebrech, D.; *et al.* Changes in autophagic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Pathol.* 2011, 178, 2708–2715.
63. Kim, S.J.; Syed, G.H.; Khan, M.; Chiu, W.W.; Sohail, M.A.; Gish, R.G.; Siddiqui, A. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014, 111, 6413–6418
64. Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y.M., Johnson, C.L., Wang, C., Fish, P.M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. 102, 2986–2991

65. Delafori J.; Oliveira Lima E and et al. Molecular signatures associated with prostate cancer cell line (PC-3) exposure to inactivated Zika virus. *Scientific Reports*. 2019 9:15351
66. Bhattacharyya S. *Inflammation During Virus Infection: Swings and Roundabouts. Dynamics of Immune Activation in Viral Diseases*. 2019
67. Casanova J-L and Abel L. Mechanisms of viral inflammation and disease in humans. *Science*. 2021.
68. Bozza F. A., Cruz O. G., Zagne S. M., Azeredo E. L., Nogueira R. M., Assis E. F., et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.* .2008
69. KI Masood and et al. Role of TNF  $\alpha$ , IL-6 and CXCL10 in Dengue disease severity. *Iran J Microbiol*. 2018
70. Lum FM.; Lye DCB.; Tan JJJ and et al. Longitudinal study of cellular and systemic cytokine signatures to define the dynamics of a balanced immune environment during disease manifestation in zika virus–infected patients. *J Infect Dis*. 2018.
71. Plociennikowska A and et al. TLR3 Activation by Zika Virus Stimulates Inflammatory Cytokine Production Which Dampens the Antiviral Response Induced by RIG-I-Like Receptors. *J Virol*. 2021
72. Komarasamy, T.V.; Adnan, N.A.A.; James, W.; Balasubramaniam, V. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Front. Immunol*. 2022.
73. Pítia Flores Ledur et al. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Scientific Reports*.2020

74. Alfano C.; Gladwyn-Ng I. and et al. The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly *Front. Cell. Neurosci.* 2019
75. Acosta-Ampudia, Y.; Monsalve, D.M.; Castillo-Medina, L.F.; Rodriguez, Y.; Pacheco, Y.; Halstead, S.; Willison, H.J.; Anaya, J.M.; Ramirez-Santana, C. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. *Front. Mol. Neurosci.* 2018
76. E Oehle.; L Watrin.; P Larre and et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014
77. Carrillo-Hernandez, M.Y.; Ruiz-Saenz, J.; Jaimes-Villamizar, L.; Robledo-Restrepo, S.M.; Martinez-Gutierrez, M. Phylogenetic and evolutionary analysis of dengue virus serotypes circulating at the Colombian-Venezuelan border during 2015–2016 and 2018–2019. *PLoS ONE* 2021, 16, e0252379.
78. Kong, L.; Lu, X.; Chen, X.; Wu, Y.; Zhang, Y.; Shi, H.; Li, J. Qigesan inhibits esophageal cancer cell invasion and migration by inhibiting Gas6/Axl-induced epithelial-mesenchymal transition. *Aging* 2020, 12, 9714–9725
79. de Sousa Cardozo, F.T.G.; Camelini, C.M.; Mascarello, A.; Rossi, M.J.; Nunes, R.J.; Barardi, C.R.M.; de Mendonça, M.M.; Simões, C.M.O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antivir. Res.* 2011, 92, 108–114
80. Castillo, J.A.; Castrillón, J.C.; Dios-Toro, M.; Betancur, J.G.; St Laurent, G.; Smit, J.M.; Urcuqui-Inchima, S. Complex interaction between dengue virus replication and expression of miRNA-133a. *BMC Infect. Dis.* 2016, 16, 29.
81. Roa-Linares, V.C.; Brand, Y.M.; Agudelo-Gomez, L.S.; Tangarife-Castaño, V.; Betancur-Galvis, L.A.; Gallego-Gomez, J.C.; González, M.A. Anti-herpetic and anti-

- dengue activity of abietane ferruginol analogues synthesized from (+)-dehydroabietylamine. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 108, 79–88
82. Felipe V.L.J.; Paula A.V.; Silvio U.I. Chikungunya virus infection induces differential inflammatory and antiviral responses in human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Acta Trop.* 2020, 211, 105619
83. D. Kim J.; M. Paggi.; C. Park.; C. Bennett and S. L. Salzberg, “Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 37, no. 8, pp. 907–915, 2019.
84. M. Pertea.; G. M. Pertea.; C. M. Antonescu, T.-C.; Chang J. T. Mendell, and S. L. Salzberg. “StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 3, pp. 290–295, Mar. 2015.
85. Y. Liao.; G. K. Smyth and W. Shi. “featureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 7, pp. 923–930, Apr. 2014.
86. R Core Team. “R: A Language and Environment for Statistical Computing,” R Foundation for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. [Online]. Available: <https://www.r-project.org/>
87. Team BC. “Homo.sapiens: Annotation package for the Homo.sapiens object.” 2015.
88. Y. Zhang.; G. Parmigiani and W. E. Johnson. “ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data,” *NAR Genomics Bioinforma.*, vol. 2, no. 3, Sep. 2020.
- 89.
90. M. I. Love.; W. Huber and S. Anders. “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2,” *Genome Biol.*, vol. 15, no. 12, p. 550, Dec. 2014.
91. Espinel-Mesa D X.; González Rugeles C I and et al. Immunomodulation and Antioxidant Activities as Possible Trypanocidal and Cardioprotective Mechanisms of

Major Terpenes from *Lippia alba* Essential Oils in an Experimental Model of Chronic Chagas Disease. *Antioxidants*. 2021

92. Liu, Z.Y.; Shi, W.F.; Qin, C.F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019, 17, 131–139.
93. Meertens, L.; Carnec, X.; Lecoin, M.P.; Ramdasi, R.; Guivel-Benhassine, F.; Lew, E.; Lemke, G.; Schwartz, O.; Amara, A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe*. 2012, 12, 544–557
94. Pletnev, A.G.; Maximova, O.A.; Liu, G.; Kenney, H.; Nagata, B.M.; Zagorodnyaya, T.; Moore, I.; Chumakov, K.; Tsetsarkin, K.A. Epididymal epithelium propels early sexual transmission of Zika virus in the absence of interferon signaling. *Nat Commun.* 2021, 12, 2469
95. Arsuaga, M.; Bujalance, S.G.; Díaz-Menéndez, M.; Vázquez, A.; Arribas, J.R. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect. Dis.* 2016, 16, 1107
96. Arévalo Romero, H.; Vargas Pavía, T.A.; Velázquez Cervantes, M.A.; Flores Pliego, A.; Helguera Repetto, A.C.; León Juárez, M. The Dual Role of the Immune Response in Reproductive Organs during Zika Virus Infection. *Front. Immunol.* 2019
97. Deibert, C.M. Gavin Stormont; Vasectomy; National Library of Medicine: Bethesda, MD, USA; StatPearls: Treasure Island, FL, USA, 2022.
98. Xia, H.; Luo, H.; Shan, C.; Muruato, A.E.; Nunes, B.T.D.; Medeiros, D.B.A.; Zou, J.; Xie, X.; Giraldo, M.I.G.; Vasconcelos, P.F.C.; et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat. Commun.* 2018, 9, 414.



99. Yuan, L.; Huang, X.Y.; Liu, Z.-Y.; Zhang, F.; Zhu, X.-L.; Yu, J.-Y.; Ji, X.; Xu, Y.-P.; Li, G.; Li, C.; et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* 2017, 358, 933–936.
100. Carbaugh, D.L.; Baric, R.S.; Lazear, H.M. Envelope Protein Glycosylation Mediates Zika Virus Pathogenesis. *J. Virol.* 2019, 93, e00113-19.
101. Zhao, F.; Xu, Y.; Lavillette, D.; Zhong, J.; Zou, G.; Long, G. Negligible contribution of M2634V substitution to ZIKV pathogenesis in AG6 mice revealed by a bacterial promoter activity reduced infectious clone. *Sci. Rep.* 2018, 8, 10491
102. Byk, L.A.; Gamarnik, A.V. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu. Rev. Virol.* 2016, 3, 263–281.
103. Spencer Clinton, J.L.; Tran, L.L.; Vogt, M.B.; Rowley, D.R.; Kimata, J.T.; Rico-Hesse, R. IP-10 and CXCR3 signaling inhibit Zika virus replication in human prostate cells. *PLoS One* 2020, 15, e0244587.
104. Moser, L.A.; Boylan, B.T.; Moreira, F.R.; Myers, L.J.; Svenson, E.L.; Fedorova, N.B.; Pickett, B.E.; Bernard, K.A. Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018, 12, e0006880
105. Quicke, K.M.; Bowen, J.R.; Johnson, E.L.; McDonald, C.E.; Ma, H.; O’Neal, J.T.; Rajakumar, A.; Wrammert, J.; Rimawi, B.H.; Pulendran, B.; et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* 2016, 20, 83–90
106. Rak-Kyun, S.; Kyung, L.J.; Sarah Shin, O. Zika Virus-Induction of the Suppressor of Cytokine Signaling 1/3 Contributes to the Modulation of Viral Replication. *Pathogens* 2020, 9, 163.
107. Spencer, J.L.; Lahon, A.; Tran, L.L.; Arya, R.P.; Kneubehl, A.R.; Vogt, M.B.; Xavier, D.; Rowley, D.R.; Kimata, J.T.; Rico-Hesse, R.R. Replication of Zika Virus in Human

- Prostate Cells: A Potential Source of Sexually Transmitted Virus. *J. Infect Dis.* 2018, 217, 538–547
108. Mladinich, M.C.; Schwedes, J.; Mackow, E.R. Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Mbio* 2017, 8, e00952-17.
109. Simonin, Y.; van Riel, D.; Van de Perre, P.; Rockx, B.; Salinas, S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, 11, e0005821.
110. Izuagbe R L. A prostate cell line model of persistent Zika virus infection RHYS ELUMI IZUAGBE BSc Biomedical Science. 2019
111. Anne Op De Beeck and et al. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. *J Virol.* 2003
112. Hsieh S C.; Tsai WY. and Wang WK. The Length of and Nonhydrophobic Residues in the Transmembrane Domain of Dengue Virus Envelope Protein Are Critical for Its Retention and Assembly in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of virology*, Apr. 2010
113. Kim JA, Seong RK, Son SW, Shin OS. 2018. Insights into ZIKV-mediated innate immune responses in human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 139(2):391–399
114. M Scott Killian. Dual role of autophagy in HIV-1 replication and pathogenesis. *AIDS Research and Therapy.*2012
115. Jackson, W. T. et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3, e156. 2005

116. Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S. F. & Chisari, F. V. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 14046–14051 2009.
117. Choi Y.; Bowman J W. and Jung J U. Autophagy during viral infection — a double-edged sword. *Nature Reviews Microbiology*. 2018
118. Levine B.; Mizushima N and W. Virgin Herbert. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011
119. Ke, P.Y. and Chen, S.S. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest.* 121, 37–56. 2011
120. Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K.Q., Ishii, K.J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K., et al. (2007). The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14050–14055.
121. Menz Anne. Diagnostic and prognostic impact of cytokeratin 18 expression in human tumors: a tissue microarray study on 11,952 tumors. *Molecular Medicine*. 2021
122. Edward r. Sherwood and et al. Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *The journal of urology*. 1989
123. Culig Z. and Puh M. Interleukin-6: A multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2012
124. Kumari N and et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biol*. 2016

125. Liu T and et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017
126. Tricarico PM, Caracciolo I, Crovella S, D'Agaro P. 2017. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochem Biophys Res Commun* 492(4):597– 602
127. Guo H.; Callaway J B and Ting J. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine.* 2015
128. Rehwinkel J and U. Gack M. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology.* 2020
129. Zhiyi Zhang, Lifang Jiang & Gucheng Zeng. Non-coding RNA: a key regulator of the pathogenicity and immunity of Flaviviridae viruses infection. *Cellular & Molecular Immunology.* 2018
130. Valdés-López J F, Fernandez G J, and Urcuqui-Inchima S. Interleukin 27 as an inducer of antiviral response against chikungunya virus infection in human macrophages. *Cell Immunol.* 2021
131. Cheng F, Ramos da Silva S, I-Chueh Huang and et al. Suppression of Zika Virus Infection and Replication in Endothelial Cells and Astrocytes by PKA Inhibitor PKI 14-22. *Journal of Virology.* 2018.
132. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H and Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett.* 2006

## **12. GRADO DE ORIGINALIDAD**

Se estableció un estudio de evolución experimental *in vitro* para modelar el fenómeno de la persistencia viral que puede ser extrapolado para la investigación de otros virus que establezca este tipo de infección. Además, este sistema experimental *in vitro* permitiría entender cómo algunos virus según las oportunidades ecológicas y evolutivas podrían

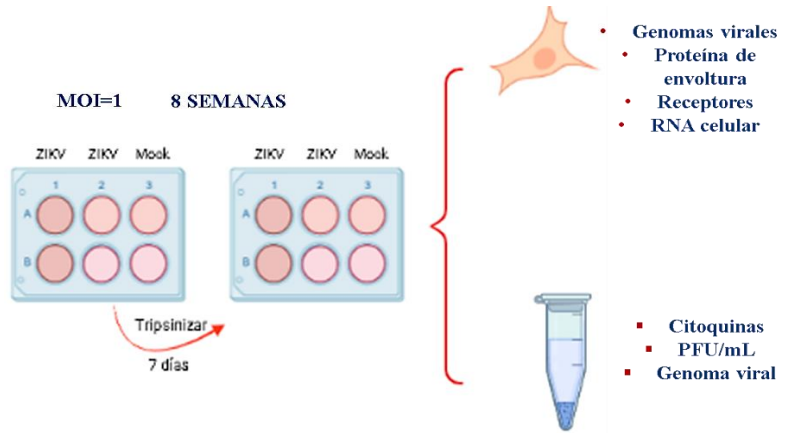
cambiar algunas características importantes que son distintivas de la biología viral y que quizás, tendrían impacto en el desenlace de la infección en una célula hospedera.

Por otro lado, la inflamación es un factor determinante para la progresión de diversos cánceres. En este aspecto, la literatura reporta que en el cáncer de próstata la IL-6 puede ser un marcador de progresión de la enfermedad toda vez que esta citoquina, permite la neovascularización y la secreción de factores de crecimiento que son elementos que están implicados en este tipo de patología. El patrón transcripcional de la respuesta inflamatoria (NFκ-B) y modulación en la producción de IL-6, conlleva a pensar en la posibilidad de diseñar un vector viral con las mutaciones identificadas en este estudio para profundizar sobre su rol en la respuesta inmune innata, modulación en inflamación y autofagia. A manera de perspectiva, esto, potencialmente, se convierte en una oportunidad- importante- de terapia génica para aquellos pacientes con cáncer y que tienen poca adherencia a los tratamientos disponibles.

Finalmente, en este modelo experimental *in vitro* otorga la ventaja de tener un sistema de evaluación antiviral de nuevas moléculas para aquellos virus cultivables que establecen persistencia.

### **13. FIGURAS SUPLEMENTARIAS**

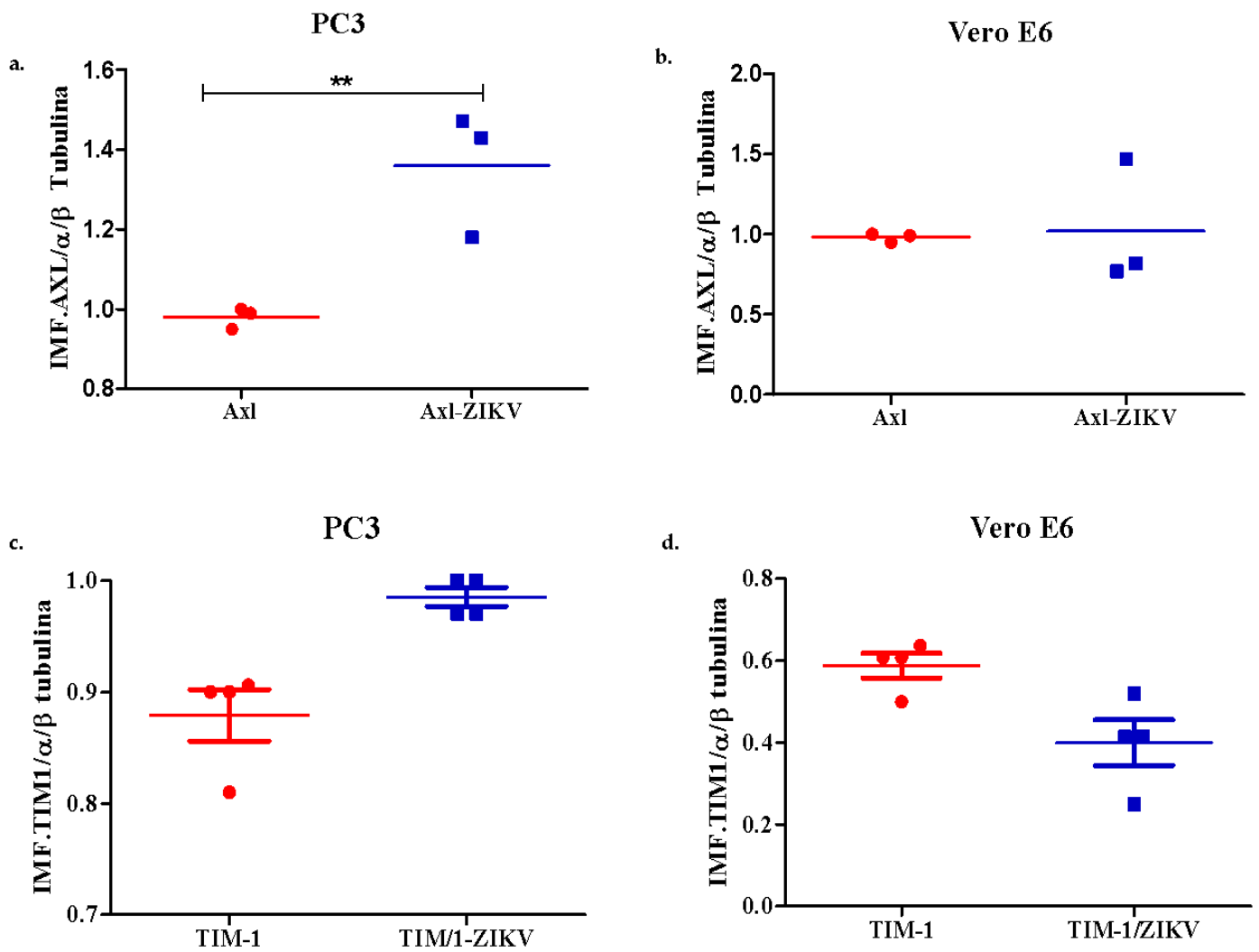
CONDICIONES DEL CULTIVO DE LA LÍNEA PC3 DURANTE 8 SEMANAS	
Subcultivo de células infectadas y no infectadas	Cada 7 días Se realizó el subcultivo con medio condicionado (50% de medio mantenimiento antiguo y 50% de medio fresco)
pH	7
Medio de mantenimiento: DMEM con Suero fetal bovino	1%



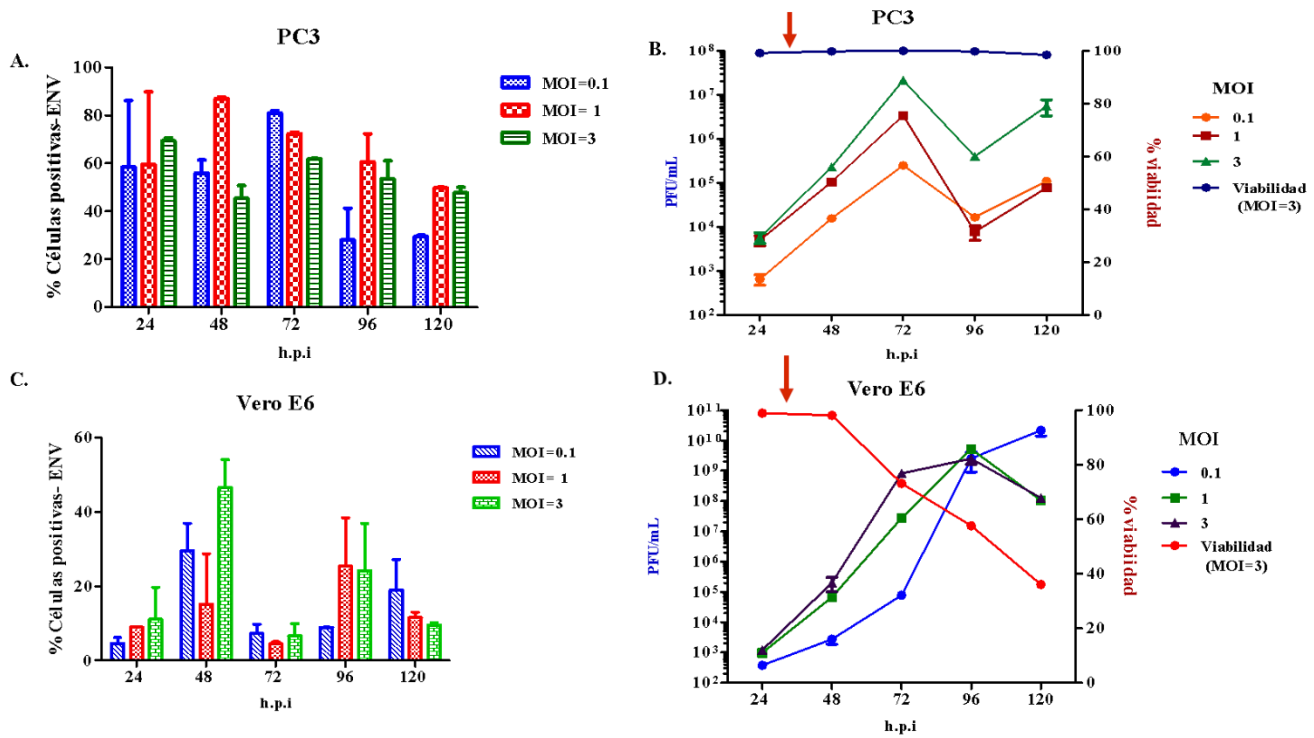
**Figura S1.** Condiciones de mantenimiento celular para el cultivo persistente (a) y esquema experimental (b). Luego de realizar estandarizaciones de dinámica de crecimiento celular con diferentes concentraciones de suero (0%, 1% y 2%); así como el seguimiento de las variaciones de pH en el medio de cultivo, se establecieron las condiciones mantenimiento celular descritas en el gráfico a

Strains	Gen Bank	Lineage	Codon position																											
			80	106	107	123	130	139	151	691	763	982	1059	1118	1274	1477	2086	2611	2634	3213	3353	3392	3403							
			C	C	C	*prM	prM	prM	prM	E	E	NS1	NS1	NS1	NS2A	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5	NS5	NS5	NS5	NS5	NS5				
ZIKV COL345SI	MH179341.1	Asian	I80	A160	D107E	V123A*	N130S	S139N	M151L	H691Y	V763M	A982V	K1059	R1118W	P1274L	A1477T	Y2086H	A2611	M2634V	T3213	T3353A	M3392V	V3403M							
ZIKV (Meta-Columbia)	MH544701.1	Asian	I80	A160	D107	V123A	N130S	S139N	M151L	H691Y	V763M	A982V	K1059E	R1118W	P1274L	A1477T	Y2086H	A2611	M2634V	T3213I	T3353A	M3392V	V3403M							
ZIKV/ Puerto Rico PRVABC59	KJ501215.1	Asian	I80T	A106T	D107	V123A	N130S	S139N	M151L	H691	V763M	A982V	K1059	R1118	P1274L	A1477T	Y2086H	A2611V	M2634V	T3213	T3353	M3392V	V3403M							
ZIKV Cambodia	KU955593.1	Asian	I80	A160	D107	V123	N130	S139	M151	H691	V763	A982	K1059	R1118	P1274	A1477	Y2086	A2611	M2634	T3213	T3353	M3392	V3403							

**Figura S2.** Identificación de las mutaciones del aislado colombiano de ZIKV. Los asteriscos indican la mutación de la proteína de cápside, C: D107E

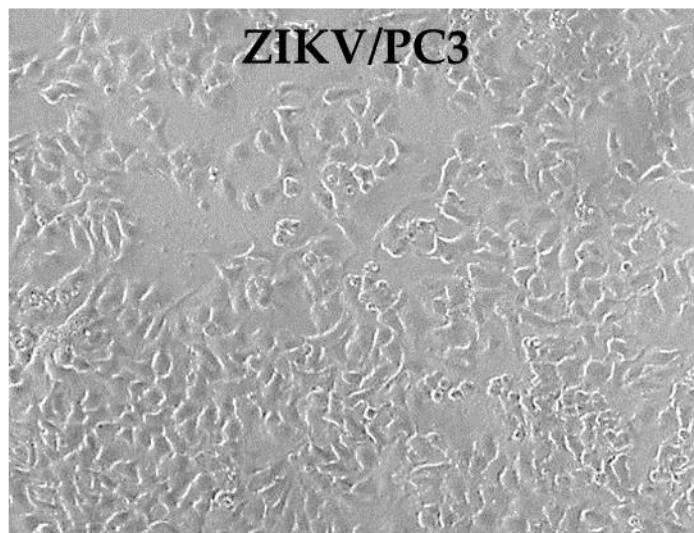
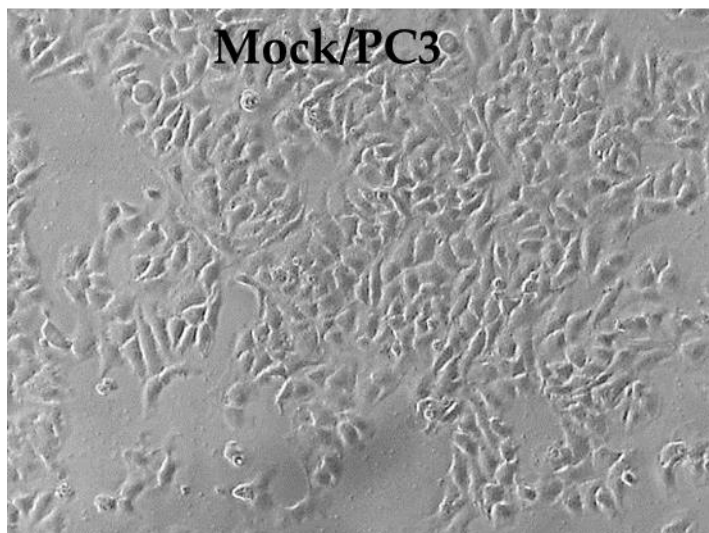
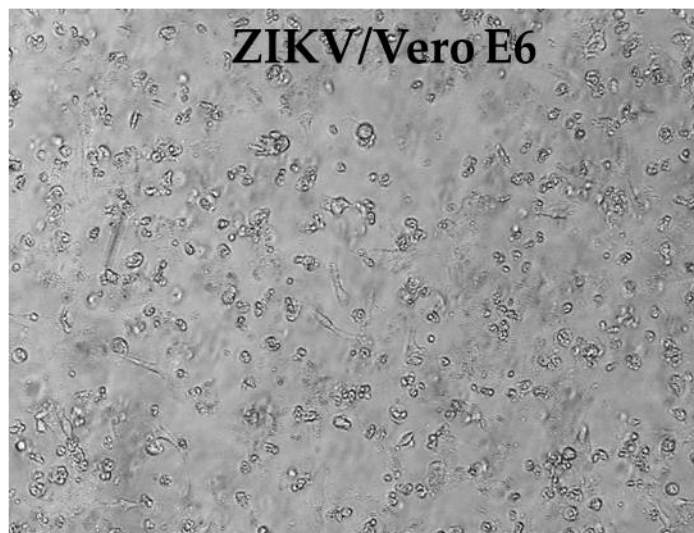
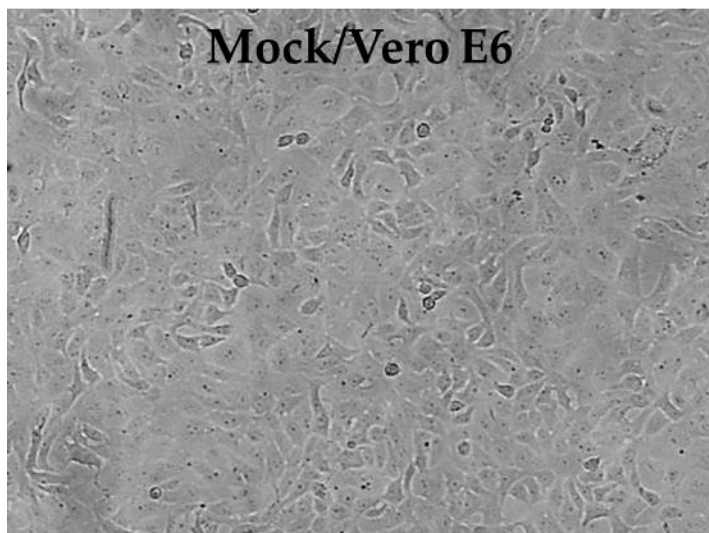


**Figure S3.** Detección de los receptores AXL y TIM-1 por *In-Cell Western* en células PC3 (a-c) y Vero E6(b-d). La evaluación se realizó en células infectadas (MOI=3) y no infectadas durante 24 h.



**Figura S4.** Permisividad del ZIKV en las células PC3 y VERO E6. El porcentaje de células PC3 (A) Vero E6 (C) positivas para la proteína de envoltura viral a MOIs de 0.1, 1 y 3, fue evaluado por citometría de flujo. Además, se determinó la dinámica de infección por la metodología de unidades formadoras placas (PFU/mL) de Vero E6 (B), PC3 (D). En flechas rojas se indica el porcentaje de viabilidad celular en las células infectadas.



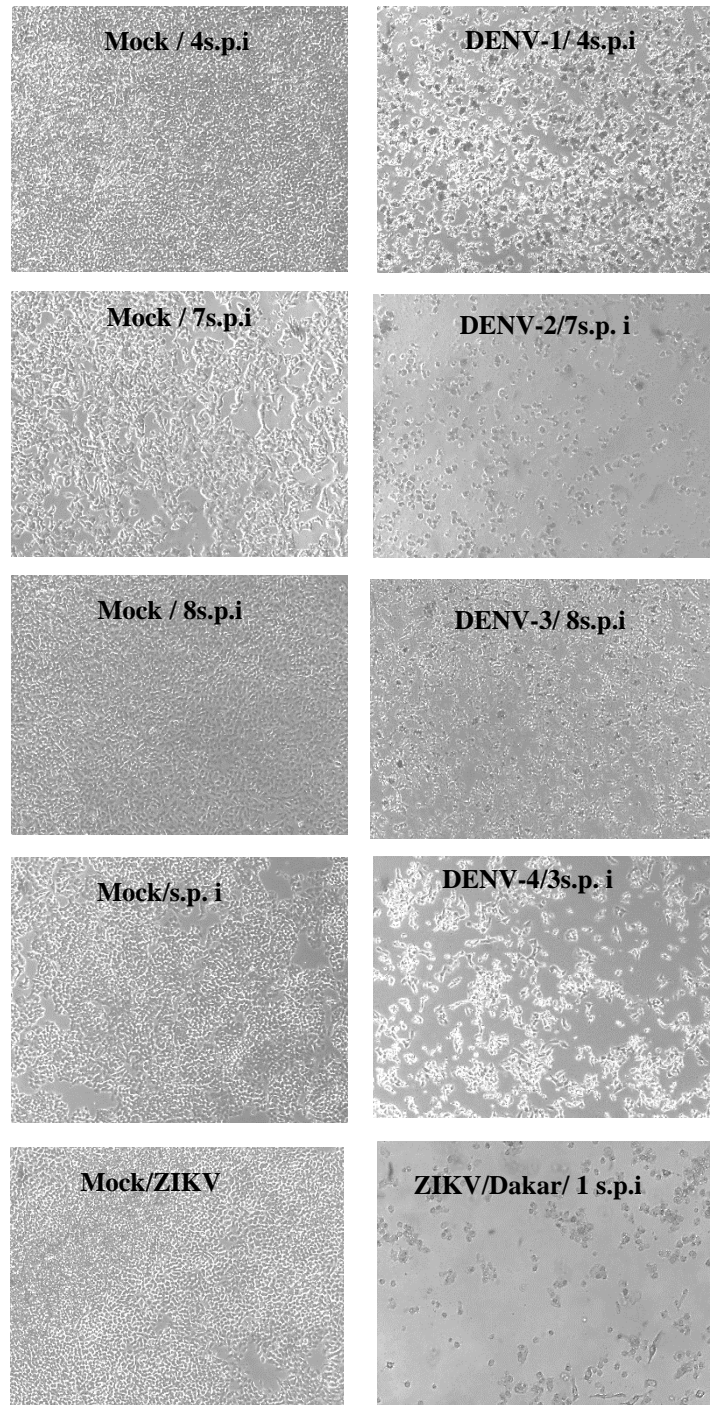


**Figure S5.** Efecto citopático de las líneas celulares Vero E6 y PC3 durante la infección por ZIKV. El Efecto citopático en las células Vero E6 (b) consiste en el redondeamiento y desprendimiento de células a los 120 h.p.i. ZIKV no causó efectos citopáticos en células PC3 (d).

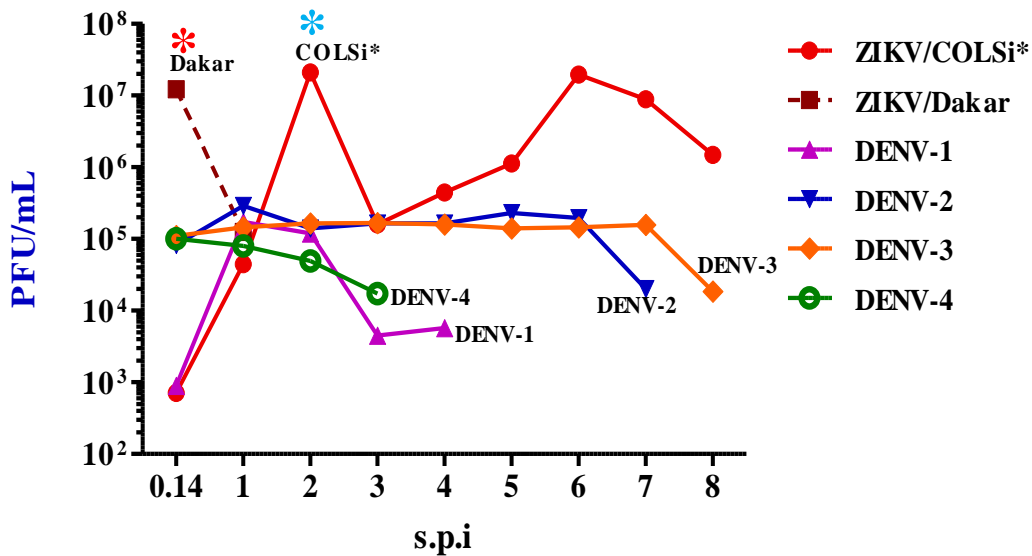
A.

Virus	Efecto citopático (CPE) en las células PC3	Tiempo de evidencia de CPE (Semanas Post-infección, s.p.i)	%Viabilidad con azul de tripano
DENV-1 (pase#6)	Redondeamiento y pérdida de adherencia	4	20-30
DENV-2 (pase#6)	Redondeamiento	7	20-30
DENV-3 (pase#2)	Redondeamiento y pérdida de adherencia	8	10-20
DENV-4 (pase#2)	Redondeamiento	3	0
ZIKV Dakar	Redondeamiento	1	0

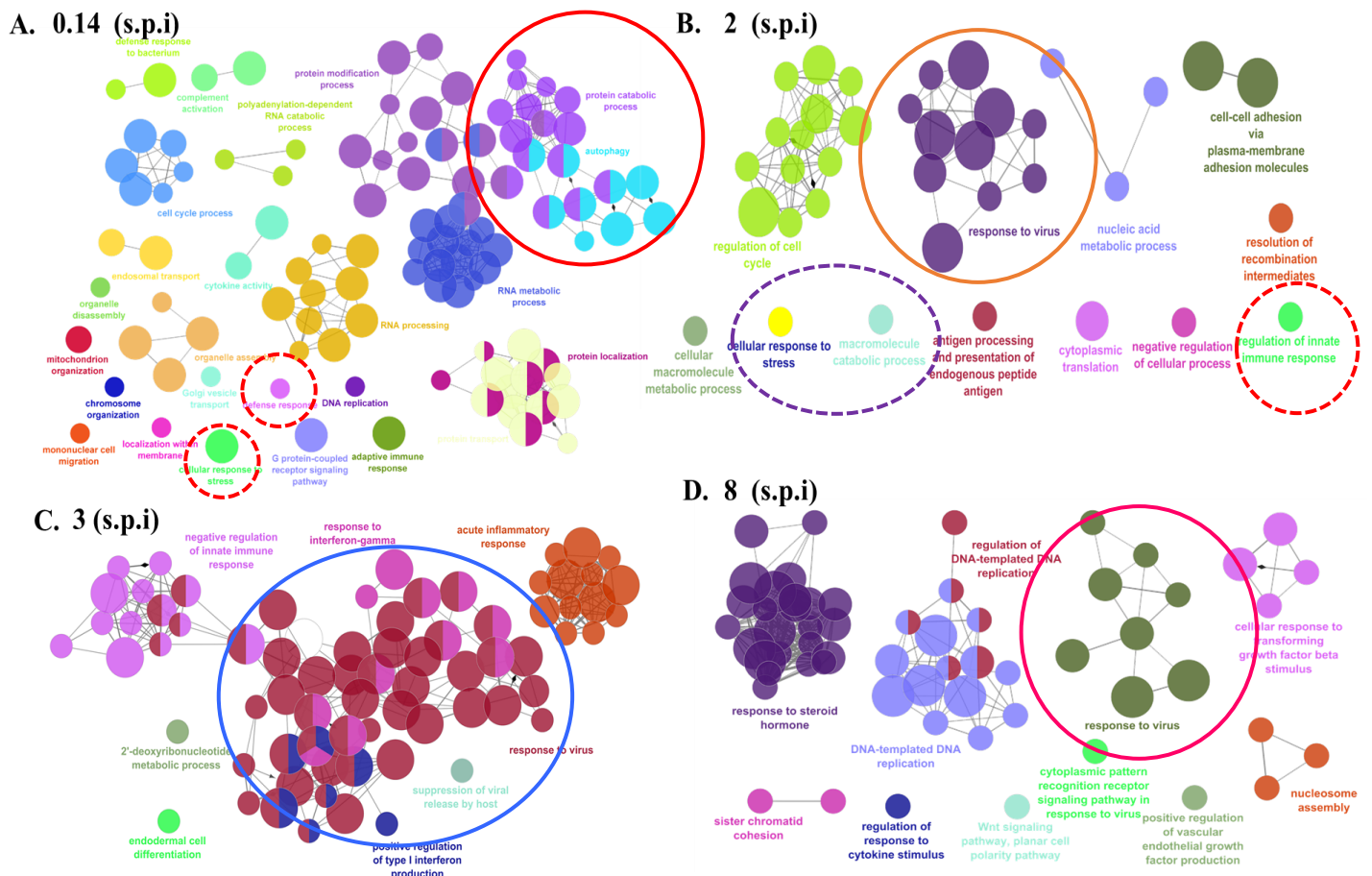
B.



**Figura S6.** La tabla describe los hallazgos de la infección con los diferentes serotipos de DENV y ZIKV/Dakar en las células PC3 infectadas (a). En términos, de CPE y viabilidad determinada por azul de tripano. En el panel (b) de muestra el CPE de los DENV (1- 4) y ZIKV/ Dakar.

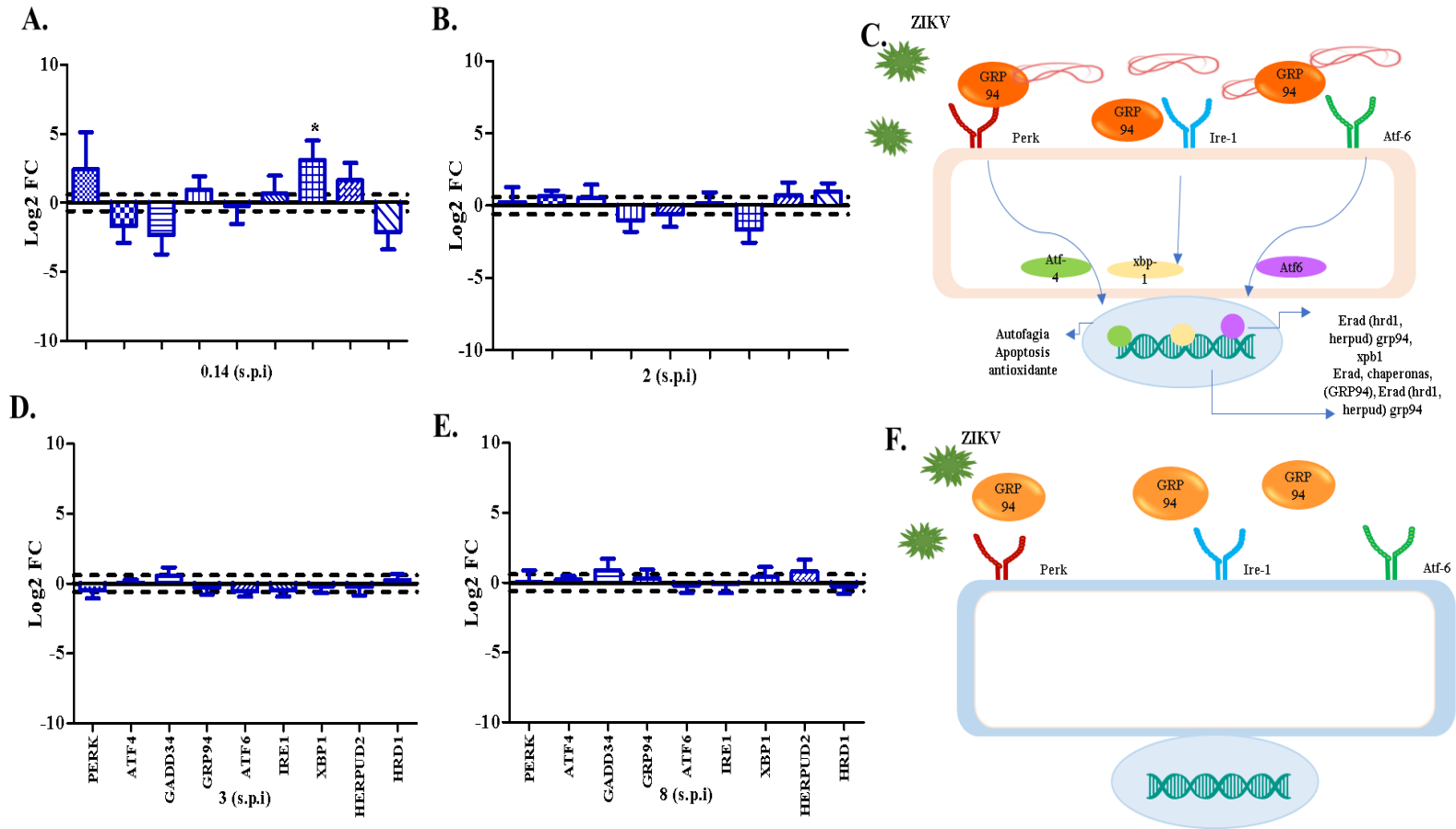


**Figura S7.** Cinética viral de flavivirus en las células PC3 durante 8 s.p.i. El gráfico se muestra la replicación de algunos virus que establecen infección aguda (DENV 1- 4) y el linaje africano de ZIKV representado por la cepa Dakar (\*). El asterisco, azul (\*) destaca el comportamiento del aislado de ZIKV de interés COLSi

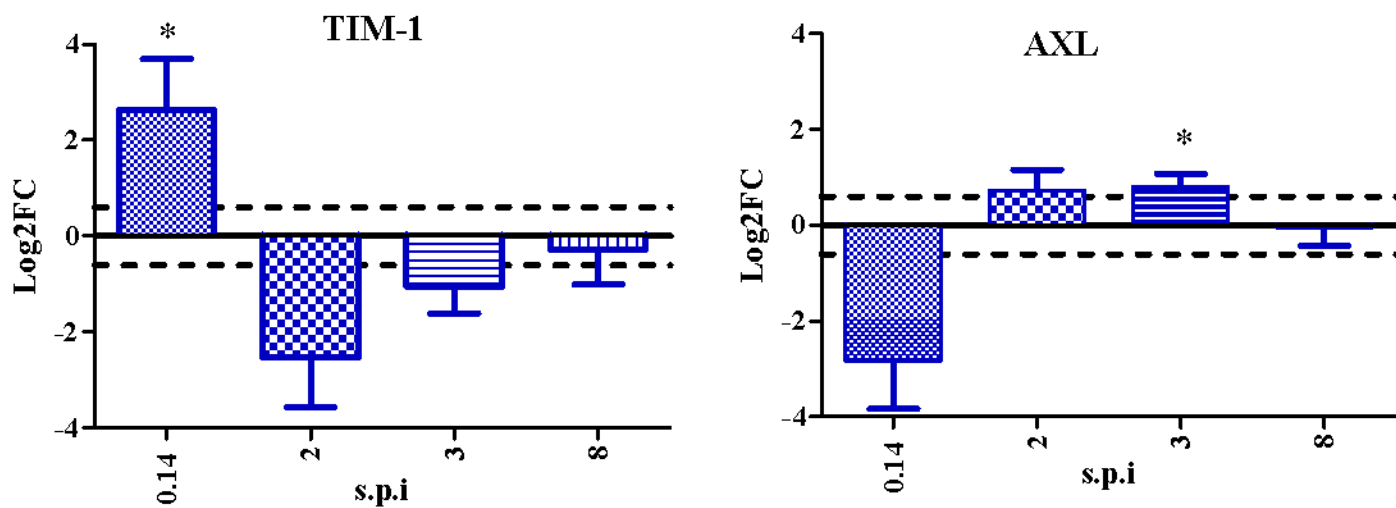


**Figura S8.** Procesos Biológicos regulados durante la infección persistente de ZIKV en las células PC3

## Estrés de retículo endoplasmático



**Figura S9.** Regulación transcripcional de estrés de retículo durante la infección persistente.



**Figura S10.** Dinámica transcripcional de los receptores TIM-1 y AXL durante la persistencia de ZIKV en las células PC3