

**Análisis comparativo del transcriptoma de cepas
mexicanas del virus zika en células de mosquito**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN:
CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

BRENDA GARCÍA HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE LA TESIS:

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

CODIRECTORA:

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Ciudad de México, enero de 2026.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente:

Dra. Lilia López Cánovas,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Secretario:

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Vocal:

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Plantel descripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTORA

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Índice

Índice	3
Índice de Figuras	5
Índice de tablas	7
Abreviaturas	8
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
Historia del zika	14
Generalidades sobre el ZIKV	14
Morfología	14
Ciclo infeccioso	21
Cuadro Clínico	24
Patogénesis en humanos	25
Características de la infección en mosquitos Aedes sp.	26
Evolución y diversidad del ZIKV	27
Transcriptómica	29
Análisis de datos de RNA-seq	30
Evaluación de Calidad	30
Alineación o mapeo	31
Cuantificación de lecturas	31
Análisis de expresión genética diferencial	31
ANTECEDENTES PARTICULARES	33
JUSTIFICACIÓN	42
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS	44
Objetivo general	44
Objetivo particular	44
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46
Cepas	46
Análisis comparativo de secuencias basada en metadatos	46
Titulación viral mediante el ensayo de formación de focos de fluorescentes	47
Infección viral	49
Purificación de RNA	49
Secuenciación masiva	51
Análisis bioinformáticos	52
Evaluación de calidad de las secuencias	52

Mapeo y conteo de reads	52
Análisis de expresión diferencial	53
Análisis de enriquecimiento	54
RT- PCR punto final	54
RT-qPCR	56
RESULTADOS	58
Determinación de la variabilidad de secuencias del ZIKV	58
Obtener del transcriptoma de las células infectadas con las tres cepas del ZIKV	59
Evaluación de calidad de las secuencias	60
Limpieza de las secuencias	61
Mapeo de las secuencias a un genoma de referencia y conteo de lectura por gen	62
Comparación de las lecturas mapeadas entre las muestras	63
Nivel de expresión génica de las muestras	64
Visualización y detección de los genes expresados diferencialmente en la infección con las tres cepas del ZIKV	66
Análisis de enriquecimiento de los términos de ontologías de genes GO	69
Análisis de transcritos diferencialmente expresados entre cepas del ZIKV	72
Determinación de la expresión del RNAm de Scylla en las células infectadas con las tres cepas del ZIKV	80
DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	101

Índice de Figuras.

Figura. 1. Estructura del virión del ZIKV.

Figura 2. Esquema del RNA genómico del ZIKV, traducción y escisiones postraduccionales de la poliproteína.

Figura 3. Zonas donde se localizan los mosquitos vectores del ZIKV (*Ae. albopictus* y *aegypti*).

Figura 4. Ciclos de transmisión del ZIKV.

Figura 5. Distribución de las cepas del ZIKV.

Figura 6. Flujo de trabajo bioinformático de RNA-Seq.

Figura 7. Proceso general de preparación de la biblioteca.

Figura 8. Evaluación de la calidad de las secuencias.

Figura 9. Tamaño de biblioteca de las diferentes condiciones experimentales.

Figura 10. Distribución de las muestras de las células no infectadas e infectadas con ZIKV según sus perfiles de expresión génica

Figura 11. Análisis de agrupamiento jerárquico de la expresión de los transcritos de las células no infectadas e infectadas con ZIKV.

Figura 12. Visualización de los genes expresados diferencialmente al comparar la expresión génica de las células no infectadas e infectadas con la cepa OAX del ZIKV.

Figura 13. Visualización de los genes expresados diferencialmente al comparar la expresión génica de las células infectadas con la cepa 31N e infectadas con la cepa OAX del ZIKV.

Figura 14. Visualización de los genes expresados diferencialmente al comparar la expresión génica de las células infectadas con la cepa PR e infectadas con la cepa OAX del ZIKV.

Figura 15. Componentes celulares vinculados a los GED en células C6/36 no infectadas contra células infectadas con ZIKV.

Figura 16. Funciones moleculares vinculadas a los GED en células C6/36 no infectadas contra células infectadas con ZIKV

Figura 17. Procesos biológicos vinculados a los GED en células C6/36 no infectadas contra células infectadas con ZIKV.

Figura 18. Representación de los GED al comparar el transcriptoma de las células C6/36 infectadas con ZIKV.

Figura 19. Detección de la expresión del RNAm de la proteína putativa de saliva y del cotransportador de fosfato inorgánico putativo a partir de células C6/36 a las 24 h post infección.

Figura 20. Detección de la expresión del RNAm de Scylla a partir de células C6/36 a las 24 h post infección.

Figura 21. Detección del genoma de ZIKV a partir de células C6/36 a las 24 h post infección.

Figura 22. Determinación de los niveles de expresión del RNAm Scylla mediante RT-qPCR en células C6/36 infectadas con las tres cepas de ZIKV a las 24 h.

Figura 23. Determinación de los niveles de expresión del RNAm Scylla mediante RT-qPCR en células C6/36 infectadas con las tres cepas de ZIKV a las 48 h.

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones de las proteínas del ZIKV.

Tabla 2. Puntaje de calidad Phred relacionada con la probabilidad de error y el porcentaje de precisión de cada base.

Tabla 3. Resumen de los diferentes artículos enfocados en el transcriptoma del ZIKV en células humanas y mosquitos.

Tabla 4. Iniciadores implementados para PCR de punto final y PCR de tiempo real.

Tabla 5. Comparación de los SNPs diferenciales por gen entre los tres grupos de secuencias del ZIKV en el continente americano.

Tabla 6. Comparación de la longitud del total de las lecturas pareadas (R1 y R2) de las células infectadas con las tres cepas del ZIKV antes y después de ser procesadas.

Tabla 7. Número total de lecturas por muestra.

Tabla 8. Genes expresados diferencialmente en la infección con las cepas OAX y 31N de ZIKV con respecto a las células no infectadas.

Tabla 9. GED en la infección con la cepa 31N con respecto a la cepa OAX.

Abreviaturas

BV-BRC: Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center.

cDNA: DNA complementario.

CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.

CMV: Citomegalovirus.

CNVs: Variaciones en el Número de copias.

DC-SIGN: Moléculas de adhesión intercelular no asociada a integrina.

dsRNA: RNA de doble cadena.

GED: Genes Expresados Diferencialmente.

GZ: Guangzhou.

hNCC: Células de la cresta neural humana.

hNPC: Células neuronales humanas.

hPN: Células Neurales Periféricas.

IMD: Inmunodeficiencia.

iPSC: Células Madre Pluripotenciales Inducidas.

JH: Jinghong.

MD: Diferencias de Medias.

MDS: Gráfica de dispersión multidimensional.

mDC: Células Dendríticas Mieloides.

NCBI, por sus siglas en inglés: Centro Nacional de Información Biotecnológica.

NCEZID: Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Zoonóticas y Emergentes.

OAX: Oaxaca.

Pb: Pares de Bases.

PR: Puerto Rico.

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones.

RdRp: RNA polimerasa viral dependiente de RNA.

RE: Retículo Endoplasmático.

RNA-Seq: Secuenciación de RNA.

RNAi: RNA de Interferencia.

RT: Transcripción Inversa.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SLA: Stem-loop A.

SLB: Stem-loop B.

sfRNAs: RNA de flavivirus subgenómicos.

SNP: Polimorfismo de único nucleótido.

STAR, por sus siglas en inglés: Spliced Transcripts Alignment to a Reference.

T_m: Temperatura de alineamiento

ZIKV: Virus del Zika.

ΨDB: pseudo-DB.

Quiero dedicar esta tesis a toda mi familia, porque, aunque la vida a veces se torna difícil, ustedes me hacen fuerte, me impiden detenerme y me motivan a alcanzar cada día más logros. Son las personas que más me conocen y saben que desde niña, yo quería aprender a hacer muchas cosas. Me motivaron a conocer el mundo y no ponerme etiquetas ni límites por ser mujer.

A lo largo de mi vida, he escuchado que, por ser mujer, no puedo hacer muchas cosas, y me enorgullece haber estudiado una carrera dedicada a la ciencia. Esta disciplina que históricamente está formada por mujeres que fueron limitadas por su género, pero cabe destacar que fueron valientes, dedicadas y sobresalientes en sus hallazgos. Tengo la dicha de conocer y convivir en la actualidad con mujeres con estas mismas cualidades: mi hermana, mi madre, mis maestras, mis amigas y mis familiares.

No sé si la vida de estas mujeres fue fácil o no, pero espero que estuvieran rodeadas de una familia como la mía, donde el amor y el apoyo siempre fueron incondicionales y alentadores para lograr lo que se proponían.

También quiero dedicarle este logro a mi yo de pequeña, a la niña curiosa que quería aprender todo y a quien hoy puedo decirle que, gracias a la ciencia, le queda toda una vida por descubrir.

Y un pequeño recordatorio: la suerte se trabaja todos los días.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) que me brindó sus instalaciones para ampliar mi conocimiento, mi visión en la vida y conocer nuevas personas.

A la Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy y a la Dra. Claudia Selene Zárate Guerra, por tomarse el tiempo para dirigirme en este proyecto y compartir sus conocimientos, al igual de aceptarme en sus laboratorios y apoyarme a dar este gran paso en mi vida.

A mis amigos, de la carrera que me dieron su apoyo en este camino, dando sus mejores consejos, conocimiento y amistad, haciendo muy amena mi estadía en la universidad.

A los profesores de la UACM, que aportaron sus conocimientos a lo largo de mi carrera, me dieron su apoyo y su dedicación en instruirme.

Al Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosa, INER a la Dra. Soto-Nava Maribel y al Dr. Ávila-Ríos por apoyarnos en la realización de este proyecto.

A CONAHCyT, que financió este proyecto con número 302979 haciendo posible el hallazgo de nuestros resultados.

A mi familia, por formar la persona que soy ahora, a mi mamá Mercedes por aportarme sus mejores cualidades como: fuerza, valentía y dedicación, que me ha enseñado a nunca rendirme, esforzarme por lo que quiero y que los límites me los pongo yo misma.

A mi papá, que me ha consolado, animado y me ha dado su comprensión en mis decisiones. Que me ha enseñado que los sentimientos y la audacia son compatibles y que el miedo existe, pero es mejor afrontarlos para vivir.

Mi hermana karla, por enseñarme lo divertido que es la vida, que la inteligencia, no siempre es sinónimo de seriedad, por ser mi mejor amiga desde que yo nací, por siempre ser mi mejor cómplice y acompañarme en mis mejores y peores momentos.

Mi esposo Ricardo, que nunca me ha hecho dejar de brillar, que siempre me apoya, que me ha enseñado que siempre necesitas de un gran apoyo para hacer grandes cosas. Que ponerte metas en el camino y concretarlas siempre se necesita de coraje, valentía y cinco minutos de break.

También quiero agradecer a mis mascotas teo, nina, luna y bonita que siempre se desvelaron conmigo haciendo tareas.

RESUMEN

El virus del Zika (ZIKV) es un arbovirus (virus que se transmite de monos no humanos a humanos, mediante artrópodos) que se transmite principalmente por mosquitos. Este virus fué aislado por primera vez en macacos Rhesus en el año 1947, en el bosque “Zika” ubicado en Uganda y tiene como sus principales vectores a los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El ZIKV es de interés mundial por la enfermedad que se desarrolla en el humano al contraerlo llamada fiebre por zika. Esta enfermedad puede ser asintomática o presentarse con síntomas leves como fiebre, dolor de cabeza y erupciones cutáneas; pero también se pueden presentar complicaciones como el síndrome congénito por Zika en recién nacidos y el síndrome de Guillain-Barré en adultos. Hasta el día de hoy, no existen fármacos ni vacunas para esta enfermedad. Aunque varios estudios describen la interacción ZIKV-humano, se conoce muy poco de cómo el ZIKV interfiere en los procesos celulares del mosquito, por lo que en este estudio determinamos las diferencias en el transcriptoma de células infectadas con dos cepas mexicanas del ZIKV una aislada de un paciente (OAX) y otra de mosquitos infectados (31N), además se incluyó la cepa de referencia aislada de un paciente en Puerto Rico durante el primer brote registrado en América en 2015 (PR), usando una línea celular del mosquito *Aedes albopictus* (C6/36). Este análisis nos permitió identificar genes expresados diferencialmente (GED) en las células infectadas en comparación con células no infectadas. De esta forma se identificaron 117 GED en células infectadas con la cepa OAX y 16 GED en células infectadas con la cepa 31N ($p < 0.05$), mientras que la cepa PR no se observaron GED estadísticamente significativas. En las células infectadas con la cepa 31N destacaron 3 GED que no se identificaron en las células infectadas con las otras dos cepas de este virus: el cofactor putativo de formato inorgánico, Tomm7 y un gen que codifica una proteína no caracterizada de saliva. Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento de términos de ontología de los GED, donde las categorías como síntesis de proteínas, el metabolismo de compuestos nitrogenados, procesos de homeostasis redox y la síntesis de ATP mostraban un enriquecimiento significativo. Por otro lado, se encontraron 13 GED compartidos en células infectadas con las cepas 31N y OAX, de éstos se seleccionó al gen Scylla con la finalidad de verificar su sobreexpresión mediante RT-qPCR. Los análisis estadísticos (T de Welch) revelaron un aumento estadísticamente significativo en la expresión del gen Scylla especialmente en células infectadas con ZIKV 31N con respecto a las células no infectadas. Por todo lo anterior, concluimos que el transcriptoma de las células infectadas con las cepas mexicanas de ZIKV de humanos y de mosquito presentan GED

coincidentes en ambos casos, sin embargo, también se presentan GED exclusivos de la cepa de mosquito (31N), los cuales podrían ser estudiados posteriormente para determinar su papel en la infección por el ZIKV.

INTRODUCCIÓN

Historia del zika

El virus del Zika (ZIKV) causa una enfermedad en humanos llamada fiebre del zika. Este agente patógeno fue identificado en 1947 en *macacos Rhesus* durante una vigilancia de rutina de la fiebre amarilla (Musso & Gubler, 2016). Un año más tarde, se detectó al virus en mosquitos *Aedes africanus* y hasta 1952, en Uganda y la República Unida de Tanzania, se identificó por primera vez en humanos. Desde entonces se determinó la presencia de este virus en un número limitado de personas hasta el año 2007, cuando se presentó el primer brote en Isla de YAP y sucesivamente se notificaron otros brotes, como el de 2013, en la polinesia Francesa y el de 2015 en Brasil (Musso & Gubler, 2016).

Hasta el momento, se han registrado brotes ocasionados por este virus en 89 países y se cree que se han presentado más, pero no se notificaron por la similitud de los síntomas con otras enfermedades. Durante estos brotes se realizaron estudios para definir los síntomas que se presentaban durante la fiebre por zika, entre los cuales identificaron como síntomas distintivos de la enfermedad las erupciones cutáneas y conjuntivitis; además se le ha relacionado con el síndrome de Guillain-Barré en adultos y con microcefalia en neonatos. Esta sintomatología fue confirmada el 1 de febrero del 2016 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization: WHO, 2016; World Health Organization: WHO, 2022b).

Generalidades sobre el ZIKV

El ZIKV pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Orthoflavivirus*. En total, los orthoflavivirus comprenden 69 virus, de los cuales 67 son arbovirus, es decir, virus transmitidos por artrópodos, principalmente insectos (Vaziri et al., 2022). En el caso del ZIKV, éste se transmite a través de la picadura de mosquitos infectados, principalmente de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Morfología

La partícula viral del ZIKV tiene un tamaño aproximado de 40 a 60 nm, se encuentra envuelta y su genoma viral consta de RNA monocatenario de polaridad positiva

(Sirohi & Kühn, 2017). El virión está conformado por tres proteínas estructurales: E, M y C. La proteína E se localiza en la capa externa del virión y se organiza en dímeros formando estructuras llamadas balsas. Cada virión consta de 30 balsas, lo que le da una forma icosaédrica. Por debajo de la proteína E se encuentra la proteína M, formando la misma estructura icosaédrica (Valente & Moraes, 2019). La capa más interna, está formada por la proteína cápside (C), que protege al genoma (Sirohi & Kühn, 2017).

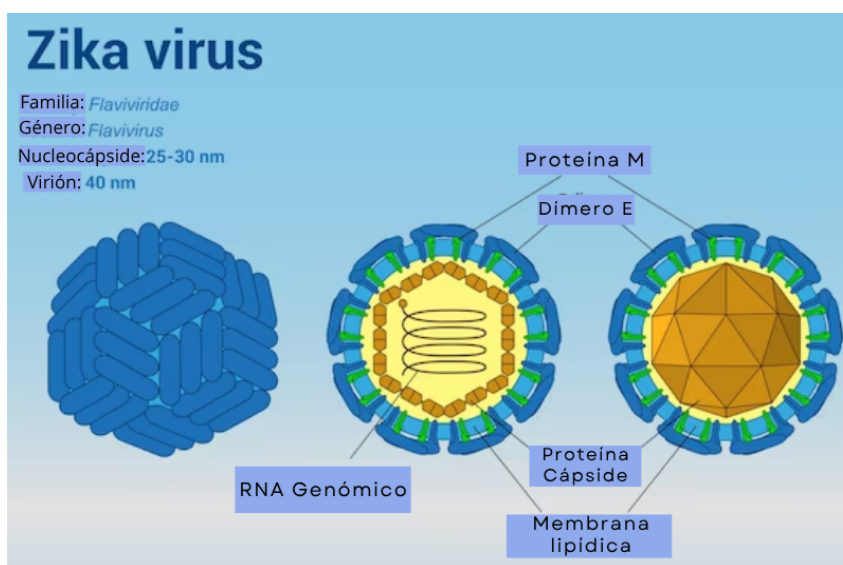


Figura 1. Estructura del virión del ZIKV. Se muestran las tres proteínas estructurales y el genoma de cadena sencilla se observa en el centro del virión, y está rodeado por una cápside icosaédrica. Imagen tomada y modificada de Vector Premium, 2020, Freepik (https://www.freepik.com/free-vector/structure-particle-genome-virion-zika-virus-infographic-template_7529802.htm).

El genoma del ZIKV tiene una longitud de 10,794 nucleótidos (nt), que codifica para un único marco abierto de lectura (ORF, del inglés Open Reading Frame), flanqueado por dos regiones no traducidas (UTR) 5' de 90 a 107 nt y 3' de 428 nt de longitud. La UTR 5' tiene una estructura cap de 7-metilguanosina, dos estructuras tallo-burbuja A y B (SLA y SLB) altamente conservadas. Otras estructuras de la UTR 5' son una horquilla pequeña junto a la región codificante de la cápside (cHP) y el pseudonudo

de la secuencia de ciclización 5' (DCS-PK) (Álvarez-Díaz et al., 2023). Estas estructuras son indispensables para la viabilidad del virus; por ejemplo, la estructura cap es esencial para proteger el RNA de las exonucleasas celulares, ayuda en el inicio de la traducción y en la exportación del RNAm del núcleo al citoplasma. Mientras que la estructura SLA es un promotor de la RNA polimerasa viral dependiente de RNA (RdRp) NS5 y la estructura SLB participan en la replicación viral, en la circularización del genoma de RNA formando una estructura complementaria mediante la unión de las UTRs 5'-3' en los extremos del genoma. Además, la UTR 5' puede formar otra estructura complementaria al unirse a la región codificante de la proteína E durante la replicación viral y en la regulación de la traducción (Nazneen et al., 2023) (Álvarez-Díaz et al., 2023). La UTR 3' del ZIKV no posee cola de poli A, como la mayoría de los RNAm eucariotas, en su lugar tiene una terminación en CU-OH (citidina, uridina y un grupo hidroxilo), esto evita que el sistema inmune del hospedero reconozca el RNA viral (Jung et al., 2022). Además, la UTR 3' contiene dos estructuras tallo-burbuja (SLI y SLII), un pseudo-DB (ΨDB), una estructura en forma de mancuerna (DB) y en su extremo 3' se encuentra una estructura tallo-burbuja denominada 3'SL que es altamente conservada. Estas estructuras son necesarias para regular la replicación viral, interaccionando con la maquinaria de replicación y estabilizando la estructura viral fundamental para dar comienzo a la replicación. Al igual que en la UTR 5', las estructuras tallo-burbuja de la UTR 3' son fundamentales para llevar a cabo ciertas actividades como los dos pares de elementos de RNA duplicados (SLI-SLII) que adquieren estructuras secundarias que pueden estabilizar el genoma y prevenir su degradación. Cuando las exoribonucleasas tratan de degradar el RNA viral, chocan con estas estructuras las cuales detienen la degradación, provocando la producción de RNA virales parcialmente degradados, conocidos como RNA subgenómicos de flavivirus (sfRNAs) los cuales son importantes para la respuesta inmune del mosquito y del humano ante el ZIKV (Pallarés et al., 2020).

El ORF del virus se traduce a una poliproteína de 3,424 aminoácidos que es procesada postraduccionalmente por proteasas celulares y virales en tres proteínas estructurales (cápside/C, pre-membrana/prM y de envoltura/E) y siete no

estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Hou et al., 2017). Las principales funciones de cada una de las proteínas virales se resumen en la Tabla 1.

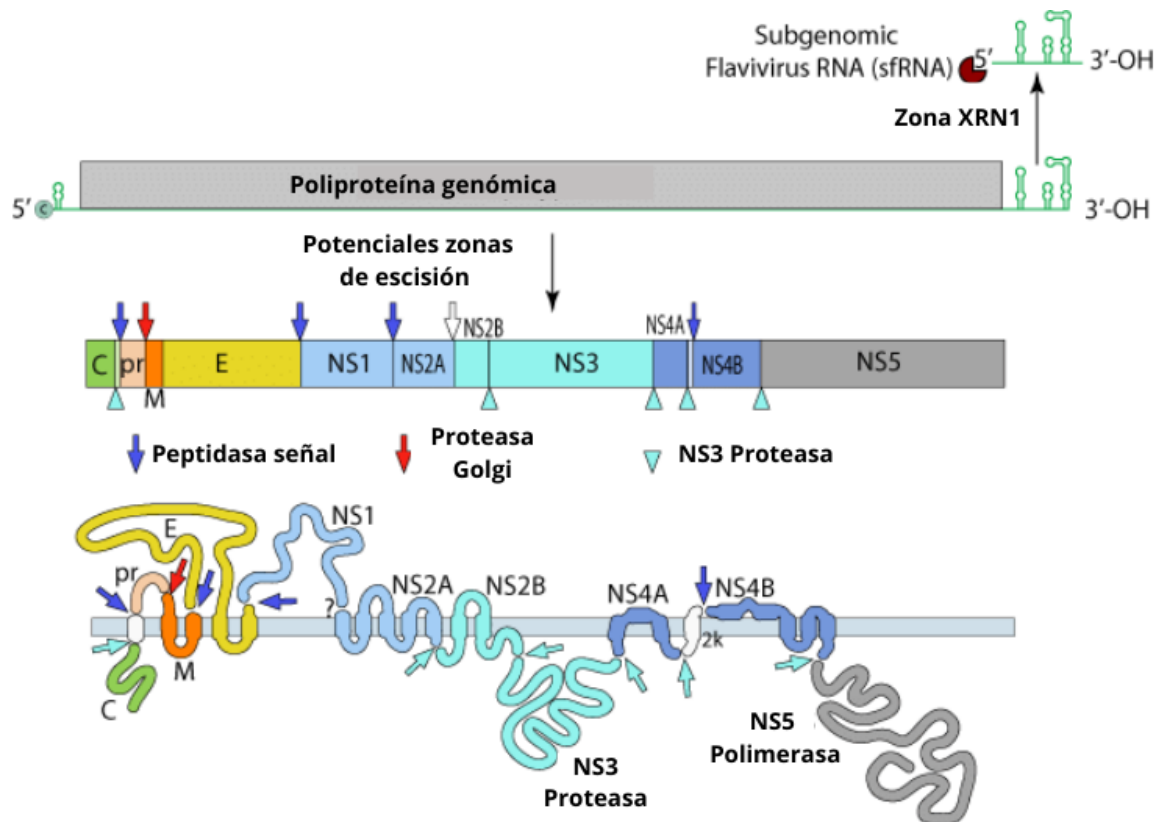


Figura 2. Esquema del RNA genómico del ZIKV, traducción y escisiones postraduccionales de la poliproteína. Imagen tomada y modificada de SIB Swiss Institute of Bioinformatics (s.f.), (<https://viralzone.expasy.org/>)

Tabla 1. Funciones de las proteínas del ZIKV

Nombre de la proteína	Características y función
Proteína de la cápside (C)	Proteína encargada de formar la cápside, cuya función principal es proteger el RNA del virus y facilitar su replicación mediante la interacción con otras proteínas tanto virales como celulares (Balinsky et al., 2013). También se ha reportado que participa en la respuesta inmune y en la regulación del metabolismo celular (Shang et al., 2018).
Proteína de pre-membrana (prM)	La proteína prM participa en el plegamiento y ensamblaje de la proteína de envoltura, en la liberación de partículas virales y en el ensamblaje del virión maduro en el momento de la escisión de esta misma proteína para producir la proteína M madura (Tangudu et al., 2023).
Proteína de Membrana (M)	Proteína involucrada en el ensamblaje y maduración de la partícula viral. La proteína M ejerce efectos citotóxicos al activar una vía apoptótica mitocondrial mediante la interacción de su ectodominio con la membrana mitocondrial del hospedero. Además, puede actuar como viroporina, formando canales o poros en las membranas celulares u orgánulos (Elliott & Mattapallil, 2024).
Proteína de Envoltura (E)	La envoltura viral está constituida por homodímeros de la proteína E. Esta proteína está relacionada con el primer paso de la infección por zika al interaccionar con receptores de la membrana celular del hospedero como: DC-SIGN, CD209 y NCAM1 (Camacho-Concha

	et al., 2023). Este factor permite la fusión de la membrana viral y la membrana celular (Khongwichit et al., 2021).
Proteína no estructural 1(NS1)	Es una glicoproteína con una estructura altamente conservada en el género <i>Orthoflavivirus</i> (Zhao et al., 2021). Se encuentra de forma soluble en la membrana viral. NS1 es esencial para la replicación y la evasión del sistema inmune. También se ha observado que la proteína soluble se ancla con el aparato de Golgi afectando las vías de transducción de señales como la vía del interferón tipo I (IFN-I), la vía NF-κB y las relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico (Zhao et al., 2021; Lee et al. 2021).
Proteína no estructural 2A (NS2A)	Esta proteína modula la respuesta inmune del hospedero y la replicación viral, ya que interacciona con proteínas celulares, tales como STING, una proteína clave en regular la señalización de la vía del interferón tipo I; proteínas mitocondriales de señalización antiviral; proteínas del RE; otras proteínas relacionadas con la membrana, el citoesqueleto y la proteína de choque térmico 70 (Hsp70), cuya interacción podría influir en la patogenicidad (Zhao et al., 2021; Lee et al. 2021). Además, NS2A podría estar contribuyendo al correcto plegamiento proteico viral y a la estabilización de complejos de replicación viral (Zhao et al., 2021)
Proteína no estructural 2B (NS2B)	Esta proteína es conocida como proteína cofactor porque trabaja en conjunto con la proteína NS3,

	formando un complejo proteico conocido como proteasa NS2B/NS3. Complejo necesario para activar la función proteolítica de la proteína NS3 (Lescar et al., 2008).
Proteína no estructural (NS3)	Esta proteína tiene dos dominios principales: la proteasa y la helicasa. NS3 ayuda a procesar a la poliproteína en proteínas separadas, mientras que el funcionamiento de la helicasa es esencial para desenrollar la estructura secundaria del RNA viral y permitir interacciones. Esta proteína es fundamental para la maduración del virus y su replicación (Lee et al. 2021).
Proteína no estructural 4A (NS4A)	Es una proteína que se encuentra en el retículo endoplasmático, consta de una región citosólica N-terminal y cuatro segmentos transmembranales (aún no comprobados) (Roosendaal et al., 2006). NS4A está involucrada en la remodelación de la membrana del RE para formar sitios de replicación (Miller & Krijnse-Locker, 2008). El sitio N-terminal interactúa específicamente con regiones curvas de la membrana haciendo posible la localización de los sitios de replicación. También se ha observado que esta proteína y la proteína NS4B inducen la autofagia en las células madre neuronales del feto, lo que conduce a un defecto neuronal (Vázquez-Calvo et al., 2017).
Proteína no estructural 4B (NS4B)	Esta proteína es de gran interés en la formulación de fármacos debido a que se encuentra involucrada en muchas funciones en el ciclo replicativo del virus,

	como en la modulación de la respuesta inmune del hospedero y puede inducir la apoptosis (Zhang et al., 2020).
Proteína no estructural 5 (NS5)	Es la proteína no estructural más conservada la cual posee una metiltransferasa N-terminal y una RNA polimerasa dependiente de RNA C-terminal necesaria para la síntesis de RNA viral. El dominio metiltransferasa N-terminal (MTasa) es necesario para la traducción, y la síntesis del cap, evitando la detección del RNAm mediante el sistema inmune del hospedero (Lee et al. 2021).

Ciclo infeccioso

El ZIKV tiene dos ciclos de transmisión: selvático y urbano. El ciclo selvático involucra primates no humanos y mosquitos arbóreos del género *Aedes* (Vasilaski et al., 2011). En el ciclo urbano hasta el momento solo se conoce como su único hospedero al humano y dos vectores principales, el mosquito *Ae. aegypti* es originario de África y se puede encontrar en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Mientras que el segundo vector *Ae. albopictus* también conocido como mosquito tigre, originario del sureste asiático, puede sobrevivir en zonas con sequías, climas fríos y zonas urbanas, lo que ha permitido la expansión del rango de este vector. (Deshpande et al., 2024).

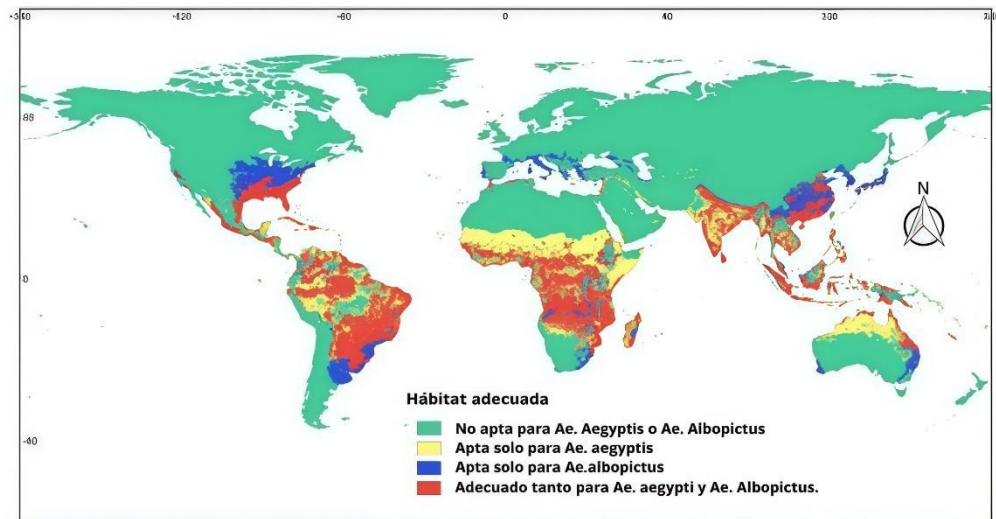


Figura 3. Zonas donde se localizan los mosquitos vectores del ZIKV (*Ae. albopictus* y *aegypti*). En verde se encuentran las zonas libres de ambas especies. En amarillo son zonas donde solo se puede encontrar la especie *Ae. aegypti*. En azul son zonas adecuadas para *Ae. albopictus* y en color rojo es adecuado para ambas especies. Imagen tomada y modificada de Leta et al., 2018.

Los mosquitos hembra se alimentan de la sangre de los mamíferos para producir huevos exitosamente, puesto que ingerir sangre les permite duplicar su peso corporal y producir entre 100 y 150 huevos por cada ingesta de sangre. En contraste, se ha reportado que la producción de los huevos es mucho menor en los mosquitos hembra que se alimentan solamente del néctar de las flores y del jugo de las frutas, como lo hacen los mosquitos macho, (Jové et al., 2020).

Los mosquitos no pueden volar largas distancias, por lo que viven muy cerca de su fuente de alimento y de superficies con agua (cubetas, plantas, neumáticos, etc) ya que los huevos necesitan pequeñas cantidades de agua para su desarrollo eficiente. Las hembras depositan los huevos en las paredes internas del contenedor con agua para que queden cubiertos, y las larvas crezcan y eclosionen, tardando entre 7 y 10 días en alcanzar la adultez. Estos huevos pueden sobrevivir hasta 8 meses en estado seco (Centers for Disease Control and Prevention, 2024).

El ciclo de transmisión del ZIKV comienza cuando el mosquito hembra se alimenta de personas infectadas y después de que se desarrolla la infección en el mosquito (entre 3 y 14 días), su saliva será portadora de partículas virales. Cuando el mosquito

infectado se alimenta de la sangre del hospedero “sano”, el virus puede transmitirse por medio de la picadura, provocando que el hospedero pueda desarrollar fiebre por zika (Mwaliko et al., 2020; Zimler & Alto, 2021).

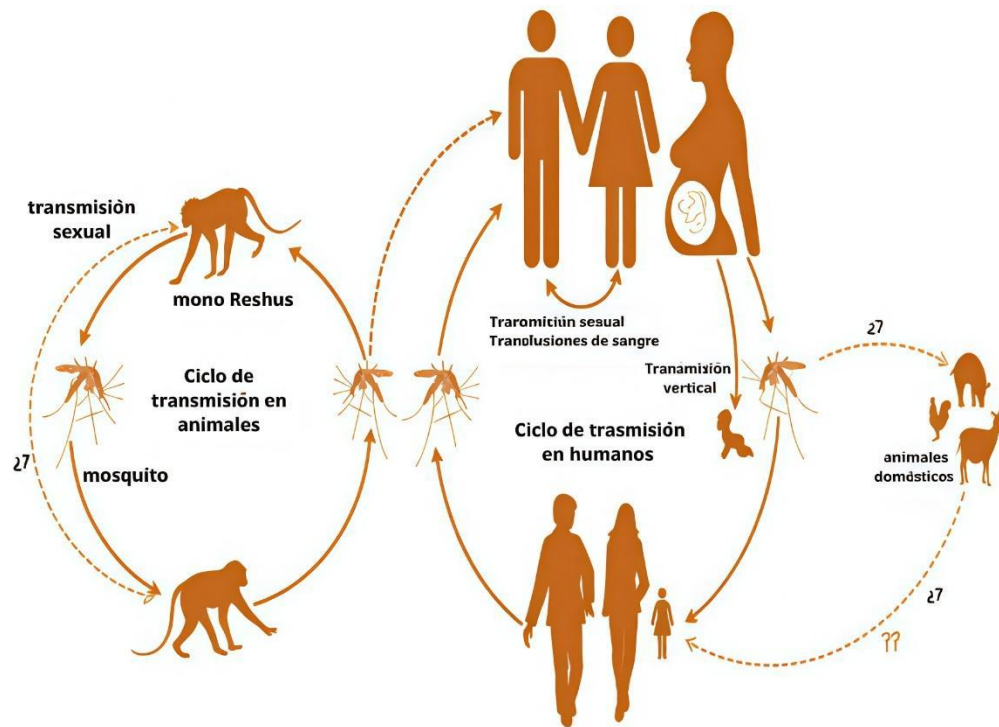


Figura 4. Ciclos de transmisión del ZIKV. En el ciclo de transmisión en animales o también conocido como selvático, el cual se da en zonas rurales, se inicia cuando los monos son picados por mosquitos infectados, bien, estos mosquitos también pueden picar a humanos que están en contacto con la fauna silvestre, iniciando con el ciclo de transmisión en humanos, el cual se da principalmente en zonas urbanas. Existen otras formas de transmisión de este virus como la vertical de madre a hijo. Imagen tomada de Pielnaa et al. 2020.

También existen otros tipos de transmisión, por ejemplo la transmisión por contacto sexual, que se ha confirmado al encontrar partículas virales en semen hasta por 21 días después de haber contraído el ZIKV, por lo que es más frecuente la transmisión de hombre a mujer. También se ha reportado transmisión vertical, es decir, cuando una mujer embarazada se infecta con ZIKV y lo transmite al feto. Esta condición fue estudiada y confirmada al identificar partículas virales en el cerebro del feto, líquido

amniótico y leche materna. Finalmente, el ZIKV también se transmite por transfusión sanguínea (Pielnaa et al., 2020b).

Cuadro Clínico

Como se mencionó anteriormente, la infección por el ZIKV puede provocar síntomas leves como fiebre, conjuntivitis, erupciones cutáneas, dolor de cabeza, dolor muscular y articular (World Health Organization, 2022). Estos síntomas pueden tener una duración de 2 a 7 días y se pueden presentar entre los 3 a 14 días después de la picadura del mosquito infectado, también conocido como periodo de incubación (Krow-Lucal et al., 2017; World Health Organization: WHO, 2022). Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) solamente 1 de cada 5 personas infectadas con el ZIKV contraerá la enfermedad, esto es que presentará la sintomatología antes descrita (CDC, 2024).

Además de los síntomas descritos, también se pueden manifestar complicaciones en mujeres embarazadas donde el bebé puede nacer con síndrome congénito por zika, en el cual se incluye la microcefalia, que es un defecto congénito que provoca la malformación de la cabeza de los bebés haciéndola más pequeña de lo normal, también presentan problemas de aprendizaje y tienen una movilidad limitada. Además, se pueden presentar partos prematuros, abortos espontáneos y hasta la muerte del feto (Antoniou et al., 2020; Anaya et al., 2017; CDC, 2024). En cambio, las personas adultas pueden desarrollar el síndrome de Guillain-Barré, el cual produce anticuerpos contra el sistema nervioso periférico y mielitis, que es inflamación de la médula espinal provocando problemas motores y sensoriales (Antoniou et al., 2020; Anaya et al., 2017; Rodríguez et al., 2018). A la fecha no hay un medicamento específico para esta enfermedad, sin embargo, se recomienda monitorear para que los síntomas no empeoren y en el caso de las mujeres embarazadas se debe monitorear el estado del feto (Voermans et al., 2019; CDC, 2024).

Las estrategias para disminuir la transmisión del ZIKV que se han implementado se centran en el control de las poblaciones de mosquitos, por un lado se realizan campañas de información para que se evite el almacenamiento de agua en recipientes sin tapa con el objetivo de eliminar zonas de reproducción del mosquito;

también se han implementado estrategias biológicas donde se han utilizado extractos de plantas con efectos repelentes y la liberación de mosquitos machos *Aedes* estériles; estrategias químicas donde incluyen compuestos que actúan en el sistema nervioso del mosquito como piretroides, organoclorados y organofosforados (Singh et al., 2018). Sin embargo, estas estrategias han demostrado poca eficacia en la reducción del mosquito en su implementación (Singh et al., 2018).

Patogénesis en humanos

Una vez que el mosquito infectado pica al humano, las partículas virales se alojan en las capas de la piel “epidermis y dermis” donde se encuentran células como: melanocitos, mastocitos, fibroblastos y células dendríticas. El virus se une a sus receptores en la membrana de la célula blanco, como el receptor DC-SIGN, el cual pertenece a los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR), y se puede encontrar en las células dendríticas; el receptor TIM-3 que se puede encontrar en las linfocitos T especializados así como en las células de la inmunidad innata como macrófagos y células dendríticas, mientras que los receptores de la familia TAM (Tyro3, Axl y Mer) y los receptores de tirosina quinasa AXL se pueden encontrar en gran variedad de células cuyas funciones están relacionadas con la señalización, división celular y respuesta inmune (Geijtenbeek et al., 2009; Seth et al., 2021b). Las células dendríticas son las más susceptibles a la infección por el ZIKV, éstas migran e infectan a cualquier órgano linfático después de ser infectadas, de esta manera el virus ingresa al torrente sanguíneo, diseminando la infección a diversas células y órganos (Seth et al., 2021b).

La unión de ZIKV con sus receptores es mediada por la proteína E, permitiendo la internalización del virión en la célula mediante endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina (Seth et al., 2021b). El pH ácido de los endosomas causa cambios conformacionales en la proteína E, permitiendo la fusión con la membrana del endosoma, originando la liberación de la cápside en el citoplasma (Agrelli et al., 2019; Seth et al., 2021b). En el citoplasma se lleva a cabo la degradación de la cápside permitiendo la liberación del genoma viral para dar comienzo a la traducción que produce una sola poliproteína, la cual tiene una etiqueta en su extremo a N-terminal que la dirige hacia el retículo endoplasmático (RE), en donde

será procesada por proteasas celulares. Con esto se formarán las proteínas individuales (Agrelli et al., 2019; Seth et al., 2021b). Una vez que todas las proteínas se encuentran de forma individual se da comienzo a la replicación, formando una “fábrica de replicación” la cual consta de una vesícula formada por la invaginación del RE, que se encuentra cubierta por filamentos intermedios y microtúbulos (Cortese et al., 2017). Esta estructura es necesaria para evadir el sistema inmune y proteger la replicación de las nucleasas celulares (Cortese et al., 2017). Una vez completada la replicación viral los viriones inmaduros son dirigidos a la red trans-Golgi, donde se empaquetan en vesículas con un entorno ácido, provocando que la proteína prM-E experimente cambios conformacionales, formando homodímeros de la proteína E. Esto provoca que el sitio de corte de la proteína prM sea expuesto y pueda ser cortado por la proteasa furina, lo que induce a la formación de viriones maduros, los cuales son liberados mediante exocitosis

Características de la infección en mosquitos *Aedes sp.*

Los mosquitos hembras pican a mamíferos para alimentarse de su sangre, por este medio los mosquitos pueden ingerir al ZIKV. La sangre infectada llega al intestino medio, donde el virus puede ser detectado por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en células epiteliales y en hemocitos, que activan algunas vías de señalización como: la vía Toll, especializada en reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); la vía de señalización de la quinasa Janus involucrada en el crecimiento y la diferenciación celular; la vía de señalización JAK/STAT es indispensable para la comunicación celular y la transcripción de señales que regulan la expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune; la respuesta mediada por RNA de interferencia (RNAi) que se enfoca en la degradación del RNA viral; y la vía de la inmunodeficiencia (IMD) que desempeña un papel similar a la vía de señalización NF- κ B de los mamíferos, encargada en detectar e iniciar una respuesta inmune eficiente. Hay muchos estudios donde vinculan esta última vía con funciones antifúngicas, aunque aún se desconoce la manera en que se relaciona con la respuesta inmune antiviral (Lee et al., 2019; Tikhe & Dimopoulos, 2021).

Una vez que el ZIKV evade el sistema inmune, los hemocitos infectados migran al hemocele que es la cavidad donde se concentra la hemolinfa. En este sitio se activa la secreción de grandes cantidades de péptidos antimicrobianos (AMP), la activación de la melanización (la cual deposita melanina alrededor del patógeno o tejido dañado para aislarlo y matarlo) por la cascada de fenoloxidasa (PO) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). El virus a través de la hemolinfa llega a las glándulas salivales, con lo que el mosquito es competente para transmitir el virus al ser humano (Lee et al., 2019). Este proceso puede tener una duración de 8 a 12 días (en algunas condiciones puede durar hasta 21 días) y también es conocido como incubación intrínseca (Zimmler & Alto, 2021).

Evolución y diversidad del ZIKV

La acumulación de mutaciones en los genomas virales puede producir variantes virales que pueden ser de interés por tener mutaciones asociadas a mayor transmisibilidad o patogenicidad. Por esto es de gran importancia la vigilancia virológica para prevenir en lo posible la dispersión de estas nuevas cepas (Metsky et al., 2017).

El ZIKV se identificó por primera vez en 1947 en Uganda (cepa MR766)(Haddow et al., 2012). En 1966 se aisló en Malasia la primera cepa del linaje Asiático conocida como P6-740 en mosquitos *Ae. aegypti*. Aunque ambas cepas han provocado diversos brotes, el linaje africano no se ha diseminado, pero el linaje Asiático se ha expandido, identificándose en Malasia en 1966, Yap 2007, Camboya 2010 y la Polinesia Francesa 2013. En los años 2015 y 2016 se detectó este virus en Brasil, Colombia, Puerto Rico y Guatemala (Hung & Huang, 2021). Al comparar las secuencias reportadas el continente americano con las secuencias de la Polinesia Francesa en 2013, se determinó una similitud del 99%; asimismo se reportó que estaban relacionadas con las cepas identificadas en la isla de Pascua, Isla Cook y Nueva Caledonia.. Lo anterior llevó a plantear que la Polinesia Francesa fue un punto de propagación mundial del virus (Hung & Huang, 2021). Al analizar la diversidad de las cepas asiático-americanas del ZIKV, se reportó que la mayor diversidad se localiza en las regiones del genoma que codifican la proteína prM/M y NS1 (Seabra et al., 2022). Así, se pudo identificar una mutación puntual en las secuencias de las

cepas asiáticas, donde una serina fue sustituida por una asparagina (S139N) en el péptido PrM dando origen a las cepas de la Polinesia Francesa y las identificadas en el continente americano (Seabra et al., 2022). Al estudiar las implicaciones funcionales de esta mutación se determinó que aumentaba la virulencia en células neuronales de los fetos de ratón. De igual manera identificó otra mutación puntual donde se sustituye alanina por valina (A982V) en la proteína NS1 provocando un aumento de la infectividad del virus en el mosquito *Ae. aegypti* (Liu et al., 2017; Seabra et al., 2022). Esta mutación se ha observado en las cepas africanas y americanas, pero no en las cepas asiáticas, lo que sugiere que ocurrió una reversión (Seabra et al., 2022).

Aunque se ha observado que las cepas africanas tienen una mayor infectividad que las cepas asiáticas, se cree que la propagación mundial de este linaje se debió al desarrollo de vectores más eficientes, como *Ae albopictus* y que estas cepas se encontraban en zonas urbanas sobrepobladas facilitando su propagación (Seabra et al., 2022).

En la figura 5 se muestran los dos linajes del ZIKV y cómo se han diseminado.

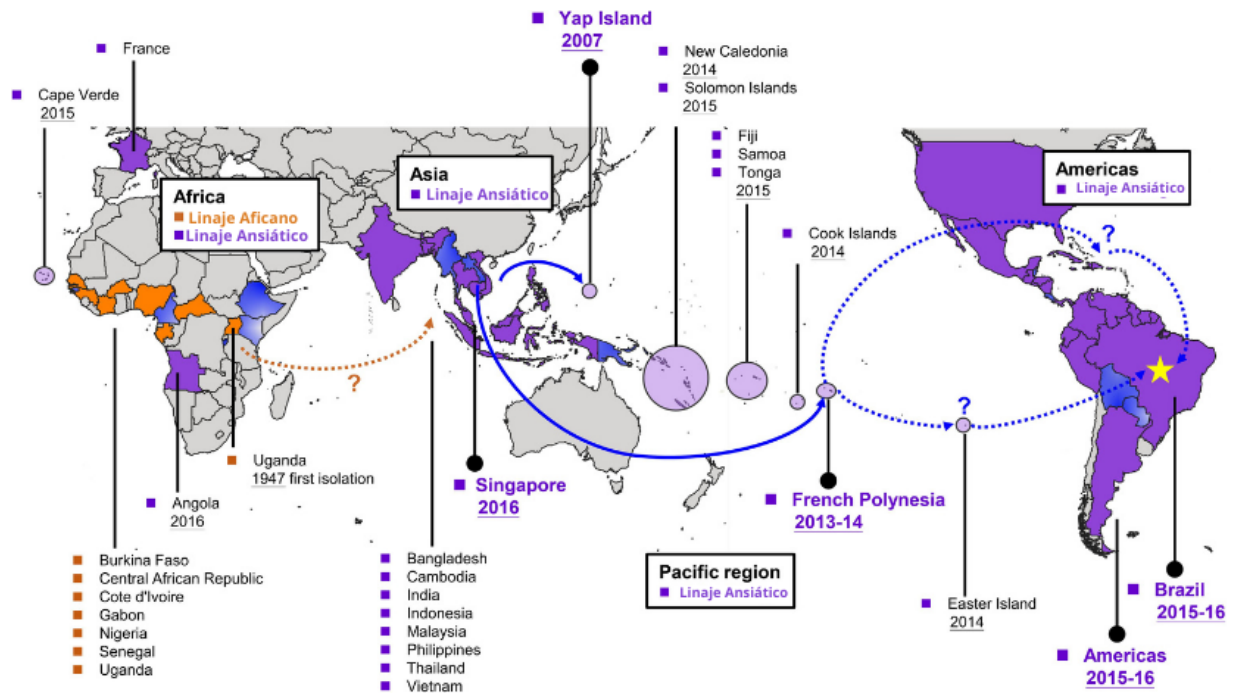


Figura 5. Distribución de las cepas del ZIKV. Los países donde se encuentran los linajes africanos están resaltados de color naranja. El linaje asiático se encuentra resaltado de color morado. Las zonas resaltadas de color azul refieren a las zonas que no han identificado el linaje. Imagen obtenida de Hung & Huang, 2021.

Transcriptómica

En este trabajo se analizará el transcriptoma, mediante la técnica RNAseq, de células de mosquito infectadas con tres cepas de ZIKV. El RNA-seq (secuenciación de RNA de nueva generación) es un análisis de la expresión genética usando en el RNA total de una determinada muestra biológica, la cual se tiene que copiar con una enzima llamada transcriptasa reversa para producir cDNA. Posteriormente se añaden fragmentos de secuencias en los extremos de los cDNA, llamados adaptadores. Los adaptadores permiten que se lleve a cabo la amplificación y secuenciación de los fragmentos. La amplificación se lleva a cabo mediante PCR, en ésta se producen múltiples copias del fragmento de interés asegurando una cantidad adecuada de material para la secuenciación (Head et al., 2014).

Análisis de datos de RNA-seq

Los datos producidos a partir de la secuenciación constan de millones de secuencias cortas (llamadas lecturas) en las que cada nucleótido está asociado a un valor de calidad. Para analizar esta información se han creado herramientas específicas y flujos de trabajo particulares para los proyectos de RNASeq. A continuación, se detallan los pasos de este flujo de trabajo.

Evaluación de Calidad

Los datos crudos obtenidos después de la secuenciación masiva pueden presentar errores en las lecturas, por lo que es necesario hacer limpieza de estas secuencias, así como remover las secuencias de los adaptadores. En la tabla 2 se indica la correspondencia entre el score de las puntuaciones Phred con la probabilidad de tener una base incorrecta (De Sena Brandine & Smith, 2019). Una puntuación aceptable es mayor a 20 ya que tiene una precisión del 99% y un margen de error de solo el 1% por lo que es considerado de buena calidad (D. B. Singh & Pathak, 2021).

Tabla 2. Puntaje de calidad Phred relacionada con la probabilidad de error y el porcentaje de precisión de cada base.

Puntuación de calidad de Phred	Probabilidad de base incorrecta	Precisión que sea la base correcta
10	$1/10 = 10\%$	90%
20	$1/100 = 1\%$	99%
30	$1/1000 = 0.1\%$	99.9%
40	$1/10000 = 0.01\%$	99.99%
50	$1/100000 = 0.001\%$	99.999%
60	$1/1000000 = 0.0001\%$	99.9999%

Tabla obtenida y modificada de Shi et al., 2016.

Alineación o mapeo

Las lecturas limpias son mapeadas contra un genoma o transcriptoma de referencia (Grant et al., 2011). El Software “Spliced Transcripts Alignment to a Reference” (STAR, por sus siglas en inglés) es uno de los más usados para hacer mapeos de transcriptoma ya que es capaz de detectar sitios de splicing. La detección de los sitios de splicing y el RNA quimérico es importante, ya que, permiten identificar la formación de diferentes isoformas presentes en el transcriptoma (Dobin et al., 2012c; Zhang et al., 2003).

Cuantificación de lecturas

En los análisis de RNA-Seq la cuantificación de las lecturas es un paso fundamental después del mapeo. En este paso se cuentan las lecturas alineadas a un cierto gen o transcrito, lo que permite determinar los genes que están diferencialmente expresados. Para llevar a cabo la cuantificación de las lecturas se pueden utilizar diversos softwares especializados en el conteo preciso de las lecturas como HTSeq, featureCounts y kallisto (B. Li & Dewey; Jin et al., 2017; Liao et al., 2013).

Análisis de expresión genética diferencial

La cuantificación de las lecturas nos permite identificar los genes expresados diferencialmente (GED). Las herramientas que realizan este análisis primero identifican el tamaño de las bibliotecas y la longitud de las secuencias al normalizar los datos, posteriormente, se cuantifica la dispersión de los datos utilizando el modelo binomial negativo y se realizan pruebas de verosimilitud para identificar los GED significativos entre las diversas muestras (Robinson et al., 2009; Xu & Kuan, 2020b; Zhang et al., 2018).

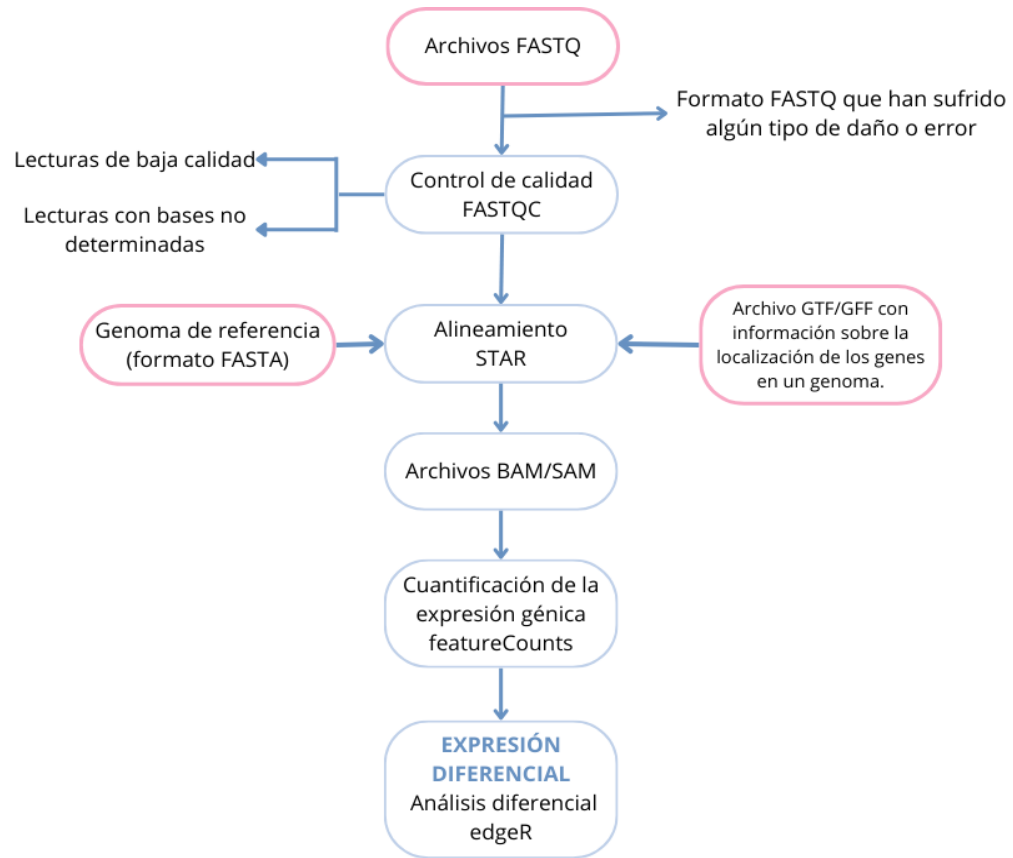


Figura 6. Flujo de trabajo bioinformático de RNA-Seq. Tomado y modificado de European Molecular Biology Laboratory, 2024.

ANTECEDENTES PARTICULARES

Los estudios sobre ZIKV y su interacción con el ser humano son importantes ya que sobre esta base se pueden elaborar estrategias para prevenir y combatir esta infección de manera eficiente. Aunque en general los síntomas suelen ser relativamente leves, se han observado varias alteraciones neurológicas post-ZIKV. Por ende, varios de los artículos publicados se han enfocado en células del sistema nervioso o células inmunes. Como en el artículo de Tamina Park et al. (2020), donde se determinó el efecto del ZIKV en las células neuronales y las células dendríticas mieloides. Para ello, compararon el transcriptoma de células neurales periféricas (hPN), células de la cresta neural humana (hNCC) y las células dendríticas mieloides (mDC), infectadas con ZIKV de linaje asiático (PRVABC59 aislado de Puerto Rico en 2015). Para llevar a cabo este análisis, recuperaron archivos de lecturas de secuencias disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Para hPN y hNCC, recuperaron 13 archivos de células madre pluripotentes humanas infectadas con ZIKV de linaje asiático (PRVABC59, aislado de Puerto Rico en 2015). Además, datos de células dendríticas mieloides (mDC) purificadas, las cuales fueron aisladas de tres mujeres adultas quienes se infectaron con ZIKV durante el otoño e invierno de 2015-2016. Los autores encontraron 1171 GED en las células hPN, 1672 GED en las células hNCC y 2601 GED en las células mieloides, esto cuando se comparó transcriptoma de células no infectadas con respecto a las infectadas con ZIKV (Park et al., 2020).

Los resultados indican que existen diferencias en la expresión génica entre las células infectadas con estas tres cepas. A partir de los GED y utilizando el Ingenuity Pathway Analysis (IPA), se identificaron los procesos biológicos con un número significativo de genes desregulados. Además, se realizaron análisis de ontología genética para identificar distintos cambios en la expresión génica en los compartimentos celulares entre las células neuronales y las mDC utilizando Enrichr. En el estudio se detectaron 43, 49 y 181 vías reguladas positivamente en hPN, hNCC y mDC, respectivamente, y 28, 11 y 44 vías reguladas negativamente. Posteriormente, calcularon la significancia estadística de cada vía utilizando la prueba exacta de Fisher y observaron que en las células neuronales infectadas se

regularon de manera positiva las vías relacionadas con la neuroinflamación y de manera negativa la reparación del DNA, un fenómeno que no se observa en las células dendríticas mieloides. Adicionalmente, reportaron que posiblemente el ZIKV evade el sistema inmune al regular negativamente la señalización de la prolactina únicamente en las mDC y no en las células neuronales. Esta citocina regula el sistema inmune al activar la expresión de receptores de citocinas y la secreción de otras citocinas. Uno de los cambios importantes detectados en las células infectadas con ZIKV es la activación de vías de señalización como JAK3 que es esencial para las células inmunes y es activado mediante la unión de las citocinas a sus receptores; otro de los factores que cambió su expresión es STAT3, es un factor de transcripción que está implicado en la respuesta inmune, en el crecimiento y en el desarrollo de las células. Por otra parte, también se observó la activación de IRF1 el cual regula la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune y antiviral (Park et al., 2020). Otro de los artículos que contribuyeron a la concepción de que el ZIKV regula el sistema inmunitario es el estudio de Xiomeng Sun et al. (2017) identificando a los genes activadores del interferón y de la respuesta inmune innata suprimidos (Sun et al., 2017). Por otro lado, entre los genes del hospedero potenciadores de la infección se encuentran sobreexpresados a AXL que cumple un papel importante al ser el receptor de entrada del ZIKV a la célula, SOCS3 que suprime la expresión del Interferon Stimulated Gene (ISG) encargado de activar el sistema inmune y el gen IDO-1 que es un inductor de las células T (Sun et al., 2017). En otro estudio, Sun y et al. realizaron análisis de células purificadas y extraídas de humanos infectados contra muestras no infectadas, lo cual resultó en 3303 GED, entre los cuales se encontraron sub-expresados algunos genes del sistema inmune previamente mencionados (Sun et al., 2017).

Por otro lado, Alyssa J. Rolfe et al. (2016) realizaron un análisis transcriptómico de células neuronales hNPC infectadas con ZIKV o con CMV (asociado a defectos congénitos) para identificar a los genes involucrados en los defectos congénitos. Los resultados indican que 3443 genes fueron sobreexpresados y 3424 sub-expresados. De manera interesante se observó que los genes a la alza en ZIKV y no en CMV estaban relacionados con la respuesta a patógenos, provocando irregularidades en el ciclo celular y la apoptosis. Las vías celulares aumentadas en la infección por ZIKV

estaban relacionadas con la regulación del metabolismo de los ácidos nucleicos mientras que el proceso biológico más enriquecido por los genes regulados a la baja fue la segregación cromosómica, vinculándolo con la microcefalia, seguido de las vías relacionadas con los trastornos congénitos del sistema nervioso y epilepsia (Rolfe et al., 2016).

En otro estudio desarrollado por Shashi Kan et al. (2017) se analizaron líneas celulares humanas como microglia (célula neuronal), BJ (fibroblasto de prepucio), 293FT (riñón embrionario) y macrófagos derivados de THP-1 (macrófagos derivados de monocitos), antes y después de ser infectadas con la cepa de ZIKV MR766. El análisis de los transcriptomas resultó en la identificación de diferencias entre cada línea celular que coincide con su susceptibilidad a la infección por el ZIKV. Además se identificaron los GED y se determinó que las vías celulares diferencialmente expresadas en las células infectadas fueron las relacionadas con el sistema inmune adaptativo, procesos metabólicos que promueven una producción viral sostenida y angiogénesis. Asimismo, se logró identificar GED relacionados con problemas cognitivos postinfección por el ZIKV. De manera interesante, se demostró que los genes de la respuesta inmune se encontraban expresados a la baja en las células de la microglia, lo cual podría coincidir con la capacidad del ZIKV de modular el sistema inmune en el sistema nervioso central (Tiwari et al., 2017).

El análisis de los resultados de los artículos citados previamente nos permite concluir que los GED después de la infección por el ZIKV pueden favorecer una infección eficiente al usar los recursos de las células humanas y disminuir la efectividad del sistema inmune. Asimismo, se observó que algunos GED en células del sistema nervioso están relacionados con problemas cognitivos y suelen presentarse después de contraer esta enfermedad viral.

Los estudios realizados hasta ahora están enfocados a la infección por ZIKV en humanos, pero hay pocos estudios del efecto de la infección por ZIKV en el transcriptoma del vector (Etebari et al., 2017). Un estudio enfocado en el mosquito es el de Ferreira et al. (2020), quienes buscaron determinar el efecto de la temperatura en el transcriptoma del vector *Ae. aegypti* alimentado con sangre no infectada e infectada con ZIKV (cepa MEX1-44), y posteriormente exponer a los mosquitos a tres temperaturas: 20°C, 28°C y 36°C. Primero, usaron como control a

los mosquitos expuestos a 28°C y al ser comparados con la temperatura de 20°C se identificaron 70 y 297 genes sobreexpresados a las 24 y 48 horas, respectivamente, mientras que 53 y 317 genes estaban sub-expresados. Por otro lado, a 36°C, se identificaron 19 y 39 genes sobreexpresados, y 89 y 79 genes sub-expresados a 24 y 48 horas post infección, respectivamente. Asimismo, compararon las muestras infectadas contra las no infectadas con lo cual se identificaron 225, 124 y 161 GED a las 24 horas post infección a los 20°C, 28°C y 36°C, respectivamente. Mientras que se identificaron 1188, 180 y 50 GED a las 48 horas a las mismas temperaturas. El análisis de ontología génica (GO) reveló que a 20°C se enriquecieron procesos de oxidación-reducción, mientras que a 36°C se destacaron genes relacionados con el metabolismo de las aminos, la homeostasis celular redox y se observó la disminución de los genes relacionados con los mecanismos celulares como la respiración y producción de energía metabólica. A 20°C contra 28°C se identificaron genes sobreexpresados vinculados con el transporte de lípidos, posiblemente para proteger a las células del estrés oxidativo, mientras que a los 36°C hubo un aumento en los genes asociados con la proteína de choque térmico 70 (HSP70) y una disminución en el transportador de trehalosa (Tret1) que se encarga de proteger a las proteínas y la membrana celular de la desnaturalización ocasionadas por estrés celular.

En un estudio realizado por Kayvan Etebari et al., (2017b) se llevó a cabo un análisis transcriptómico del vector *Ae. aegypti* para identificar los GED al comparar las muestras expuestas a la infección por ZIKV a 2, 7 y 14 días post-infección. Los resultados mostraron 298 GED a los 2 días, con cambios mínimos respecto al grupo control. A los 7 días, se identificaron 944 GED, siendo este el punto con mayores alteraciones en la expresión génica y a los 14 días, se observaron 303 GED en los tejidos del mosquito completo. Asimismo, se han realizado otros estudios en mosquitos como el de Nan Jia et al., (2023) donde buscaron determinar si la infección por ZIKV se veía afectada por la competencia vectorial entre diferentes poblaciones de *Ae. albopictus*. Para llevar a cabo este análisis seleccionaron mosquitos de diferentes ciudades de China: Jinghong (JH) y Guangzhou (GZ) y fueron infectados con la cepa ZIKV SZ01. Los resultados indican que en el transcriptoma de los mosquitos de GZ había una mayor alteración en el intestino medio y las glándulas salivales con respecto a los mosquitos de JH mostrando una

mayor competencia vectorial. Otro de los hallazgos interesantes fue que la diferencia más notable en el transcriptoma se observó en las glándulas salivales donde se identificaron 59 GED, posteriormente fueron analizados bioinformáticamente y se identificó que el gen del citocromo P450 304a1 fue el único disminuido significativamente, pero no observaron que afectará la replicación viral.

Estos estudios nos permiten reforzar la necesidad de conocer los mecanismos del ZIKV para interaccionar con el vector bajo diferentes condiciones las cuales podrían alterar la eficiencia de la transmisión del virus.

En la Tabla 3 se realizó un resumen de los estudios acerca del transcriptoma de células infectadas con ZIKV.

Tabla 3. Resumen de los diferentes artículos enfocados en el transcriptoma del ZIKV en células humanas y mosquitos

Autor y fecha de publicación	Tipo de Células/Tejidos	Virus Usado	Número de DEG	Vías o genes regulados	Observaciones Clave
Tamina Park et al. (2020)	hPN, hNCC, mDC	ZIKV linaje asiático (PRVAB C59)	hPN: 1171, hNCC: 1672, mDC: 2601	Vías reguladas a la alza: hPN: 43 vías. hNCC: 49 vías mDC: 81 vías Vías reguladas a la baja: hPN: 28 vías. hNCC: 11 vías mDC: 44 vías	ZIKV en hPN, regula positivamente la neuroinflamación y negativamente la reparación del DNA. Mientras que el ZIKV podría evadir el sistema inmune

					mediante regulación negativa y disfunción mitocondrial en mDC.
Xioming Sun et al. (2017)	Células dendríticas mieloides purificadas de adultos infectados y no infectados	ZIKV	3303	Genes a la alza: AXL, SOCS3, IDO-1. Genes a la baja: interferón y activadores del sistema inmune innato.	ZIKV puede suprimir la respuesta inmune dependiente del interferón. Las células dendríticas modifican su transcriptoma a favor del ZIKV.
Alyssa J. Rolfe et al. (2016)	hNPC	ZIKV y CMV	Comparativo con CMV se encontraron 3443 genes regulados positivamente y 3421 regulados negativamente.	Genes a la alza: respuesta a patógenos, ciclo celular, apoptosis. Genes a la baja: segregación cromosómica.	En la infección con ZIKV, se observaron irregularidades en la segregación cromosómica, vinculándolo con la microcefalia. Otra vía fue la de trastornos congénitos del

					sistema nervioso y epilepsia
Shashi Kan et al. (2017)	Microglia, BJ, 293FT y THP-1.	ZIKV cepa MR766		Las vías reguladas a la alza se relacionan con respuesta antiviral y neuroinflamación. Las vías reguladas a la baja incluyeron aquellas relacionadas con la neurogénesis y la regulación del ciclo celular.	El ZIKV puede inducir cambios significativos en procesos de neurogénesis y desencadenar respuestas neuroinflamatorias. Estos efectos pueden contribuir a complicaciones neurológicas, como la microcefalia y otros trastornos del desarrollo neurológico.
Ferreira et al. (2020)	Intestino medio de hembras <i>Aedes aegypti</i> (Tejido)	ZIKV (cepa MEX1-44)	Comparación de muestras inf y no inf. a 20°C: 225 (24 h), 1188 (48 h) 28°C: 154	Aumento en genes de oxidación-reducción y metabolismo de lípidos a 20°C; Regulación al	En la infección con ZIKV a 20°C se modularon genes relacionados con inhibición de la

			(24 h), 180 (48 h) 36°C: 161 (24 h), 50 (48 h)	alza de HSP70 a 36°C; Disminución de Tret1 (transportador de trehalosa) a 36°C	replicación viral y aumento en genes de inmunidad innata, metabolismo de ROS. En la infección a 36°C se encontró una mayor expresión de HSP70 y reducción en Tret1, afectando el metabolismo del mosquito.
Kayvan Etebari et al., (2017b)	Mosquitos en general	ZIKV	- 2 días postinfección (pi): 298 GED. - 7 días pi: 944 GED. - 14 días pi: 303 GED.		El tiempo de infección influye significativamente en la expresión génica, con una activación máxima a los 7 días y estabilización a los 14 días, sugiriendo

					adaptación del mosquito al virus.
Nan Jia et al., (2023)	Intestino medio y glándulas salivales de <i>Aedes albopictus</i>	ZIKV (cepa SZ01)	- 59 GED asociados a la competencia a vectorial.	- <i>Citocromo P450 304a1</i> regulado a la baja.	La competencia vectorial varía según la población del mosquito.

Líneas celulares: células neurales periféricas (hPN), células de la cresta neural humana (hNCC), células dendríticas mieloides (mDC), Células neuronales humanas derivadas de células madre pluripotenciales inducidas (hNPC), fibroblastos (BJ), riñón humano (293FT) y macrófagos (THP-1); virus: Citomegalovirus (CMV).

JUSTIFICACIÓN

El ZIK es un arbovirus transmitido por la picadura de mosquitos hembras principalmente del género *Aedes*, como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Estas especies de mosquitos se encuentran en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Entre los factores más importantes en la transmisión de este virus está la sobrepoblación que provoca la convivencia cercana con animales, la expansión y facilidad en el traslado de comercio. La infección provocada por el ZIKV puede presentar síntomas como: fiebre, dolor de cabeza y erupciones cutáneas, así como complicaciones entre las que se encuentra microcefalia en neonatos y síndrome de Guillain-Barré en adultos. Hay más estudios sobre la interacción del ZIKV con el hospedero humano que los que se centran en la interacción del ZIKV con el mosquito. En este estudio nos proponemos identificar genes que modifican su expresión ante la infección por la ZIKV en el mosquito que ayuden a elucidar los mecanismos que le permiten establecer la infección del vector. El presente estudio plantea el uso de RNA-Seq para determinar los cambios en el transcriptoma de las células C6/36, que provienen de larvas de *Ae. albopictus*, al ser infectadas con cepas del ZIKV aisladas en México obtenidas de humanos y mosquitos.

Este estudio tiene como perspectivas conocer más a fondo las estrategias que usa este virus para favorecer su multiplicación en los mosquitos e identificar nuevos blancos potenciales para el control de la transmisión del ZIKV.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este proyecto nos planteamos conocer a mayor profundidad las estrategias que utilizan las células de mosquito para responder ante la infección con virus aislados de distintos orígenes con la finalidad de comprender el impacto de las diferencias en el genoma viral sobre la expresión génica del hospedero. Además, es importante establecer los genes de mosquitos expresados diferencialmente en las infecciones por cepas mexicanas de ZIKV.

HIPÓTESIS

El análisis comparativo del transcriptoma de células de mosquito infectadas con cepas del virus zika de humano o de mosquito permite identificar diferencias en la expresión génica a consecuencia de la infección viral.

OBJETIVOS

Objetivo general:

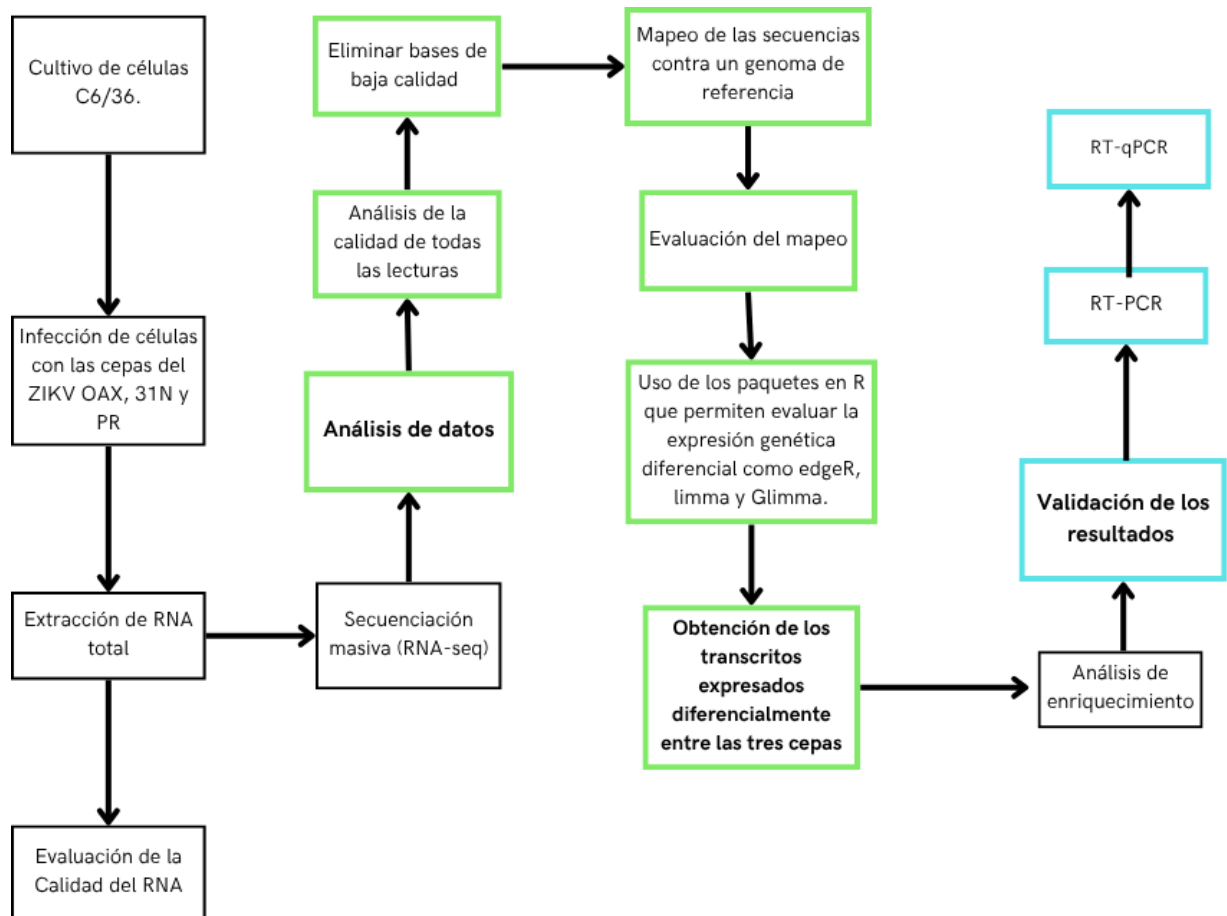
Determinar si existen diferencias en el transcriptoma de células de mosquito infectadas con cepas mexicanas del virus zika obtenidas de humano y de mosquito.

Objetivo particular:

1. Analizar las diferencias a nivel genómico de cepas del virus zika provenientes de humano y mosquito.
2. Obtener el perfil transcripcional de las tres cepas del virus zika incluidas en el estudio.
3. Determinar las diferencias en el transcriptoma de las tres cepas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Con la finalidad de cumplir los objetivos planteados se siguió la siguiente estrategia experimental:



MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Las cepas de ZIKV que se usaron para la infección fueron: OAX, 31N y PR.

- La cepa de ZIKV OAX fue obtenida de un paciente masculino de 80 años procedente de Santa María Mixtequilla, Oaxaca, México en 2016, la muestra sanguínea fue tomada tres días después de que este presentara síntomas, el suero se usó para el aislamiento viral en células Vero.
- La cepa de ZIKV 31N se obtuvo de un grupo de larvas de mosquito eclosionadas de huevos colectados en Jojutla, Morelos, México en 2016. Dichas larvas fueron procesadas para obtener extractos que se utilizaron para inocular células C6/36 (larvas de *Ae. albopictus*) con la finalidad de aislar ZIKV transmitidos verticalmente.
- La cepa de ZIKV PR (PRVABC59) fue aislada de una muestra de suero humano de Puerto Rico en 2015 y depositada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Este virus fue adquirido del catálogo de American Type Culture Collection (ATCC) y fue aislada en células Vero E6.

Análisis comparativo de secuencias basadas en metadatos

Se obtuvieron ZIKV de la base de datos ViPR (Virus Pathogen Resource), ahora alojada en BV-BRC. Los criterios de inclusión fueron secuencias del continente Americano, y una combinación del hospedero y año de recolección de la siguiente manera:.

- ZIKV Humano 2015: Se recuperaron 85 secuencias provenientes de muestras humanas recolectadas en 2015, año en el que se aisló la cepa control en Puerto Rico a partir de humano.
- ZIKV Humano 2016: Se recuperaron 711 secuencias provenientes de muestras humanas recolectadas en 2016, año en el que se aisló ZIKV OAX a partir de humano.

- ZIKV Mosquito 2016: Se recuperaron 36 secuencias provenientes de muestras de mosquitos recolectadas en el año 2016, año en el que se aisló ZIKV 31N a partir de larvas de *Aedes aegypti*.

Las secuencias de ZIKV de las cepas descritas están depositadas en el GenBank: Oaxaca (KY120349.2) y ZIKV 31N (KX446951.2). La secuencia de ZIKV PR (PRVABC59), con el número de catálogo VR-1843 fue descargada de la página web de ATCC (<https://www.atcc.org/>). Dichas secuencias fueron alineadas con la secuencia de referencia mediante el programa MAFFT v7 (Kato & Standley, 2013). Posteriormente se analizaron con la herramienta especializada en comparar metadatos como Meta-CATS, disponible en el servidor BV-BRC [Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (<https://www.bv-brc.org/>)]. Los archivos generados por Meta-CATS revelaron el número de variables detectadas en función de la posición específica dentro de las secuencias analizadas. Después, se eliminaron las variables no significativas con un valor de $p < 7.4 \times 10^{-6}$. Este análisis nos permitió identificar variaciones genéticas significativas entre grupos de secuencias (Pickett et al., 2013; BV-BRC, s. f.).

Titulación viral mediante el ensayo de formación de focos de fluorescentes

- A) Cultivo celular. Se sembraron células C6/36 de origen epitelial, derivadas de tejidos embrionarios del mosquito *Aedes Albopictus*, que crecen en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina y 50 u/ml de penicilina, 50 µg estreptomicina y 1.1 g/L bicarbonato de sodio. Las células se incubaron a una temperatura de 28°C en una atmósfera con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70-80%.
- B) Infección con ZIKV. Las células C6/36 fueron infectadas con las cepas del virus del Zika (ZIKV) OAX, 31N y PR. Se prepararon cinco diluciones seriadas en base 10 de cada cepa viral, utilizando medio sin suero como diluyente. Las células C6/36, previamente cultivadas hasta alcanzar un 70-80% de confluencia, se lavaron con medio sin suero, se añadieron las diluciones virales homogeneizadas y se incubaron a 28°C durante 2 h, con agitación

suave cada 15 min. Concluido este tiempo, se añadió medio completo para ajustar la concentración del SFB a 1%. Las células infectadas se mantuvieron en condiciones de incubación durante 24 h.

- C) Fijación. Después del periodo de incubación, se retiró el medio de las células infectadas y se lavaron tres veces con PBS (1 mL por pocillo), a temperatura ambiente, con agitación suave para evitar desprendimiento celular. Posteriormente, se añadió paraformaldehído al 4% y se dejó reposar por 20 min a temperatura ambiente, luego se retiró.
- D) Permeabilización. Después de la etapa de fijación, las células se lavaron tres veces con PBS, bajo las condiciones descritas previamente y se añadió metanol a -20°C, dejando reposar durante 20 min en hielo. El metanol se retiró rápidamente y las células fueron lavadas tres veces con PBS.
- E) Tinción. Después de la fijación, las células se trataron con el anticuerpo primario de conejo contra NS1 (suero policlonal donado por el Dr. Juan Ludert, Cinvestav-IPN) diluido 1:1000 en PBS con 0.5% de tween y 1% de SFB. El anticuerpo primario se añadió a las células y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, seguido de una incubación por toda la noche a 4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con PBS con Tween al 1%. Enseguida se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRP (peroxidasa de rábano), diluido 1:1500 en PBS con 0.5% de Tween, y se incubó a 37°C durante 1 h. Después de retirar el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados con PBS con 1% de Tween, y se añadió la solución reveladora. Para el revelado, se utilizó el kit DAB Substrate Kit, Peroxidase with Nickel (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se dejó incubar hasta que se observó una pigmentación adecuada.
- F) Determinación del número de unidades formadoras de focos por mililitro (FFUs/mL). Finalmente, las células se observaron al microscopio para la cuantificación de los focos de infección determinados por la acumulación de la proteína viral NS1. Primero se eligió la dilución con un número adecuado de focos contables, posteriormente se utilizó la siguiente fórmula para calcular el número de FFUs por mililitro (FFU/mL):

$$\text{FFU/mL} = \frac{\text{Número de focos contados}}{\text{Volumen de inoculación (en mL)}} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

Donde:

- Número de focos contados: Es el número de focos en la dilución.
- Volumen de inoculación: Es el volumen de la suspensión viral que se añadió a cada pozo, generalmente expresado en mililitros.
- Dilución: Es la dilución del virus que produjo ese número de focos contados.

Infección viral

Una vez determinado el título viral en unidades formadoras de focos (FFUs) para cada cepa, se procedió a infectar las células C6/36 en placas de 12 pozos siguiendo la técnica previamente descrita, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 1 en un volumen de 500 µl. Las células se incubaron durante 24 h. Al finalizar este periodo, las células se lavaron 3 veces con PBS y se lisaron utilizando 350 µl de Trizol y un período de incubación de 5 min, según lo descrito por el fabricante y se guardaron a -70°C.

Purificación de RNA

Las muestras almacenadas en Trizol fueron descongeladas y se les adicionó cloroformo en una proporción de 0.2 ml por cada ml de trizol, siguiendo las indicaciones del protocolo específico. Las muestras se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se separaron las fases y se recuperó cuidadosamente la fase acuosa incolora, que contiene el RNA. Esta fase se transfirió a un tubo nuevo, se añadió etanol en una proporción 1:1, se agitó la mezcla y se centrifugó brevemente. Las muestras fueron transferidas a una columna de purificación de RNA y centrifugadas a 800 rpm durante 1 min para permitir la unión del RNA a la columna. El líquido obtenido fue desechado.

Posteriormente, se añadieron 500µl de buffer de lavado (40 mM Tris, 4 mM EDTA y etanol al 60%). Las columnas se centrifugaron a 800 rpm durante 1 min y el líquido

obtenido fue nuevamente desechado. Este paso de lavado se repitió una vez más para asegurar la eliminación de impurezas.

Finalmente, las columnas se centrifugaron a 13,000 rpm durante 2 min para eliminar cualquier remanente de buffer, y luego fueron transferidas a tubos nuevos, y se añadieron

50

µL de agua libre de nucleasas directamente sobre la membrana para la elución del RNA. Después de dejar reposar las columnas a temperatura ambiente durante 3 min, se realizó una centrifugación a 14,000 rpm durante 2 min. El RNA eluido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop y las muestras fueron almacenadas a -70°C.

Adicionalmente, se realizó la eliminación de los RNA ribosomales (rRNA) usando el kit NEBNext® rRNA Depletion Kit v2 (Human/Mouse/Rat) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 5µg de RNA de cada muestra se utilizaron para este procedimiento en el cual se adicionaron 2 µL del buffer de depleción (NEBNext v2 rRNA) y 2 µL de buffer de hibridación (NEBNext), se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente las mezclas se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones: 2 min a 95°C que se fue disminuyendo hasta llegar a los 22°C a una velocidad de 0.1 °C por segundo. Concluido este proceso, se trataron las muestras con RNasa H usando 15 µL del RNA hibridado en la etapa anterior, 2 µL de buffer de RNasa H, 2 µL de RNasa H y 1 µL de agua para completar 20 µL de reacción. Después de homogeneizar, la mezcla se incubó a 37°C por 30 min. Posteriormente, se llevó a cabo un tratamiento con DNasa I para lo cual el volumen completo de la reacción anterior se mezcló con 5 µL de buffer de DNasa, 2.5 µL de DNasa I y 22.5 µL de agua para llevar a un volumen de 50 µL, se homogeneizó y se incubó a 37°C por 30 min.

La siguiente etapa es la purificación de RNA que permanece en la mezcla, después de la eliminación de los RNA ribosomales y de cualquier DNA contaminante mediante afinidad a perlas magnéticas. La mezcla resultante de los tratamientos anteriores se integró a 110 µL de la solución conteniendo las perlas magnéticas, se homogeneizó y se incubó por 15 min en hielo, luego se colocaron los tubos en una gradilla magnética y después de 5 min se tomó cuidadosamente el sobrenadante y se agregaron 200 µL de etanol al 80%. Después de 30 s, se tomó y se desechó el

sobrenadante y se repitió este procedimiento, luego se permitió que la pastilla conteniendo las perlas y el RNA se secarán por un máximo de 5 min. Después se añadieron 8 µL de agua libre de nucleasas, se mezcló y se incubó por 2 min a temperatura ambiente, se pusieron los tubos en la gradilla magnética y después de 5 min se tomaron 6 µL del sobrenadante conteniendo el RNA libre de RNAr y se transfirieron a un tubo estéril, se cuantificó el RNA en nanodrop y se guardó a -70°C.

Secuenciación masiva

Las muestras se enviaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) para realizar una secuenciación masiva RNAseq (shotgun) por illumina. Usando el sistema de lectura paired-end 2 x 75pb, siguiendo los protocolos del fabricante.

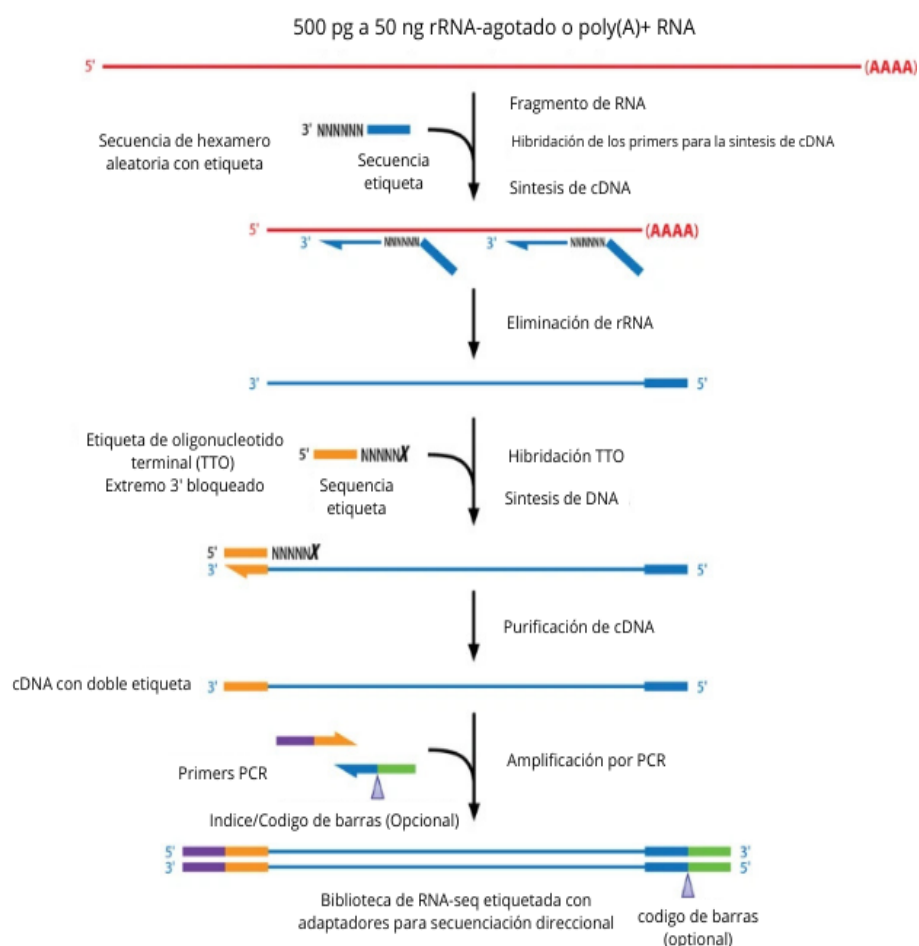


Figura 7. Proceso general de preparación de la biblioteca. Imagen adquirida y modificada de Pease, J., & Sooknanan, R. (2012).

Análisis bioinformáticos

Evaluación de calidad de las secuencias.

Para evaluar la calidad de nuestras secuencias, empleamos el software FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010). El cual acepta secuencias en formato Fastq y nos permite determinar la calidad de cada nucleótido. Posteriormente se utilizó la siguiente línea de comando para realizar la limpieza de archivos FASTQ con Trimmomatic-0.39 (Bolger et al., 2014).

```
$trimmomatic-0.39.jar PE -threads 4
-phred33/31N_24h_C6_36_L001-ds.d5a343fd87eb43df96978c074f38ce76
31N-24h-C6-36_S7_L001_R1_001.fastq.gz
31N_24h_C6_36_L001-ds.d5a343fd87eb43df96978c074f38ce76/31N-24h-
C6-36_S7_L001_R2_001.fastq.gz 31N_1/31N_1_24L001R1_paired.fq.gz
31N_1/31N_1_24L001R1_unpaired.fq.gz/31N_1/31N_1_24L001R2_paired
.fq.gz /31N_1/31N_1_24L001R2_unpaired.fg.gz
ILLUMINACLIP:/Users/selene/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE
.fa:2:30:10:2:True LEADING:0 TRAILING:1 MINLEN:36
```

Mapeo y conteo de reads

Utilizamos STAR Aligner v2.7.10 (Dobin et al., 2013) para generar un índice que contuviera la secuencia de referencia (GCF_002204515.2) utilizando la siguiente línea de comando:

```
$STAR --runThreadN 4 --runMode genomeGenerate
--genomeDir./Aedes --genomeFastaFiles
GCF_002204515.2_AaegL5.0_genomic.fna --sjdbGTFfile
GCF_002204515.2/genomic.gtf --sjdbOverhang 74.
```

Posteriormente las secuencias se mapearon contra esta secuencia de referencia, utilizando la siguiente línea de comando:

```
$STAR --runThreadN 4 \ --readFilesIn
31N_1_24L001R1_paired.fq.gz 31N_1/31N_1_24L002R1_paired.fq.gz
31N_1/31N_1_24L003R1_paired.fq.gz,
31N_1/31N_1_24L004R1_paired.fq.gz
31N_1/31N_1_24L001R2_paired.fq.gz,
31N_1/31N_1_24L002R2_paired.fq.gz,
31N_1/31N_1_24L003R2_paired.fq.gz,
31N_1/31N_1_24L001R2_paired.fq.gz \
--genomeDir Aedes \ --outSAMtype BAM Unsorted \
--outFileNamePrefix 31N_1_24_unsorted \ --outSAMunmapped Within
\ --readFilesCommand gunzip -c
```

A continuación se calculó el número de reads por gen usando el programa featureCounts versión 2.0.3.

```
featureCounts -p -ab ncbi_dataset genomic1.gtf -o 31N_24_1.tsv
31N_1_24Aligned.sortedByCoord.out.bam
```

y se escribió un script de python para generar un solo archivo .tsv (anexo II) con todos los resultados de featureCounts, Por último, el script fue validado al inspeccionar la integridad del archivo, verificando que las filas y columnas no estuvieran vacías y que la estructura general de los datos fuera consistente.

Análisis de expresión diferencial

Para realizar el análisis de expresión diferencial se utilizó el paquete edgeR (Chen et al., 2025) en la plataforma R que realiza análisis de la expresión diferencial utilizando el modelo de distribución binomial que toma en cuenta las diferencias biológicas y experimentales (Chen et al., 2025). En seguida se utilizó el paquete Limma (Ritchie et al., 2015) que implementa el método voom para evaluar la expresión diferencial de los genes, aplicando la matriz de diseño que representa las condiciones experimentales y utilizando los parámetros por defecto de normalización y ajuste de

varianza (Law et al., 2014; Diboun et al., 2006). Finalmente empleó el paquete Glimma (Su et al., 2017b) para realizar gráficas de volcanes interactivas sobre los GED que permite obtener mayor información de cada gen, como su número de acceso, la medida del cambio relativo en la expresión de (logFC), p-value y las cuentas por millón (CPM), medida del cambio relativo (Law et al., 2014; Su et al., 2017). Finalmente, se compararon los transcriptomas de las células infectadas con las tres cepas del ZIKV (OAX, 31N y PR) a las 24 h post infección por separado contra el transcriptoma de las células no infectadas.

El código de R que permite realizar este análisis se muestra en el anexo III. Los datos obtenidos del análisis de expresión diferencial se utilizaron para generar un diagrama de Venn con la finalidad de mostrar las similitudes y diferencias entre los tres grupos de secuencias. El diagrama se generó utilizando el software R antes descrito y la librería VennDiagram (H. Chen & Boutros, 2011) usando el código mostrado en el anexo IV.

Análisis de enriquecimiento

Para identificar las funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos de los GED en la infección por ZIKV se realizó un análisis de enriquecimiento con la ayuda de las herramientas de VectorBase (<https://vectorbase.org/vectorbase/app>). Esta base de datos ofrece recursos bioinformáticos enfocados en la investigación en vectores invertebrados que transmiten patógenos a humanos. Después de haber identificado las vías a las que pertenecen los genes diferencialmente expresados durante la infección viral y para construir las gráficas se tomaron en cuenta sólo las vías que tuvieran más de 10 genes vinculados. Los análisis de GED se enfocaron hacia tres tipos de clasificaciones: componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos. Los resultados se graficaron usando el lenguaje de programación R y la librería ggplot2 usando el código mostrado en el anexo V (Wickham, 2016).

RT- PCR punto final

Los extractos de RNA total se utilizaron para generar DNA complementario (DNAc) mediante el uso del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher)

siguiendo las instrucciones del proveedor. Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 20 µl con los siguientes componentes: 2.0 µl de Buffer RT 10x, 0.8 µl del Mix de dNTPs 25x, 2.0 µl de Random Primers 10x, 20 U de inhibidor de RNAsas y 50 u de la enzima Multiscribe RT. Las muestras se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 5 min a 85°C y 4°C por tiempo indefinido.

Después de haber obtenido el cDNA se procedió a realizar PCR usando los iniciadores que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Iniciadores implementados para PCR de punto final y PCR de tiempo real

Nombre de los iniciadores/oligonucleótidos	Longitud	Tm	Secuencia
ZIKA 960-1200	240 pb	58°C	FW(960): GAT TGC CCC GGC ATA CAG
			RV(1200): GGC TTC ACC TTG TGT TGG
Scylla	172 pb	60°C	FW: GGA AGG TGA AGG TCG AGA GTC
			RV: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TCG
S7	288 pb	55°C	FW: GGG ACA AAT CGG CCA GGC TAT C
			RV: TCG TGG ACG CTT CTG CTT GTT G

putative inorganic phosphate cotransporter (COPO4)	189 pb	59°C	FW: CCT ATC CAC CAC TAT CAC CC
			RV: ACC CAT CAT CAC TCA ACA ATC
putative salivary (PROSAL)	200 pb	62°C	FW: ACT CCT CCG TAA GCA TCT C
			RV: ACA GCC TCA TCA AAA GCA TC
TOMM7	160 pb	57°C	FW: TGA ATC TAT CAG CAG CAG CC
			RV: TGC CAC AGC AAA CTC ATT AC

Posteriormente se realizó la PCR usando el kit “Master Mix Gold 360” para lo cual se preparó una mezcla de reacción que contenía 5 µL del Master Mix 2x, 1 µL de cDNA, 1.25 µL de primer Forward (2 µM), 1.25 µL de primer Reverse (2 µM) y agua hasta alcanzar un volumen final de 10 µL. Posteriormente, las muestras se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de alineamiento (T_m), 30 seg a 72°C y por último 4°C por tiempo indefinido.

RT-qPCR

Los ensayos de RT-qPCR se realizaron con el cDNA obtenido usando la metodología descrita anteriormente y la reacción de qPCR se realizó utilizando el kit “Quantitect SYBR green PCR master mix”, para cada muestra se preparó una mezcla de reacción que contenía 5 µL del Master Mix 2x, 2.5 µL de cDNA, 1.25 µL de primer Forward (2µM), 1.25 µL de primer Reverse (2 µM) y agua hasta alcanzar un volumen final de 10 µL. Posteriormente, se colocaron las muestras en el termociclador con las siguientes condiciones: 2 min a 50°C, 15 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 94°C, 30

seg a la T_m de cada primer (Tabla 4), 30 seg a 72°C y por último 4°C por tiempo indefinido.

En este caso se busca determinar la cantidad del RNAm Scylla y el RNAm del S7 implementado como RNAm de referencia de normalización (Todas las muestras se sometieron a este análisis por triplicado biológico y duplicado técnico). Los valores de Ct fueron utilizados para calcular la abundancia relativa del gen de interés usando la fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ con lo cual se determina el nivel de expresión relativo. Cabe mencionar que no se tienen los datos de eficiencia de la reacción por lo tanto se asumió que ambos tienen 100% de eficiencia. Como primer paso se calculó la ΔCt para normalizar los datos con respecto al RNAm de normalización ($\Delta Ct = Ct$ transcrito de interés - Ct transcrito de referencia). Posteriormente se calcula la $\Delta\Delta Ct$ que es la diferencia entre ambas ΔCt ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct$), la $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ que es el nivel de expresión de cada condición con respecto al control y se obtuvo el promedio de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ de las tres réplicas biológicas. Estos valores se archivaron en un formato csv para ser implementados en Python antes descrito, se desarrolló un código (anexo VI) para calcular la media y el error estándar, necesario para evaluar la variabilidad entre réplicas biológicas y la magnitud de cambio. El estudio estadístico T de Welch se utilizó para comparar los resultados obtenidos de las células infectadas con las tres cepas del ZIKV y el grupo control de células no infectadas a las 24 h y 48 h, posteriormente se realizó un ajuste de Bonferroni.

RESULTADOS

Determinación de la variabilidad de secuencias del ZIKV

Con el objetivo de determinar la variabilidad de los genomas del ZIKV, se obtuvieron las secuencias a partir de las bases de datos ViPR y BV-BRC. Posteriormente las secuencias fueron alineadas con MAFFT y sometidas a un proceso de limpieza con ayuda del software AliView para eliminar los genomas incompletos y retirar los extremos UTR's para conservar el marco abierto de lectura (secuencia codificante). A continuación, estas secuencias fueron sometidas a un análisis comparativo utilizando la herramienta Meta-CATS basada en metadatos, disponible en la base de datos BV-BRC. Los metadatos nos permiten organizar las secuencias a partir de características particulares en este caso se compararon tres grupos humanos 2015 (H2015), humanos 2016 (H2016) y mosquito 2016 (M2016). Estos grupos fueron seleccionados para identificar las diferencias en el transcriptoma del ZIKV infectadas con cepas obtenidas de humano y mosquito en los años 2015 y 2016.

Enseguida se determinó el número de SNPs con frecuencias diferenciales presentes en cada gen en relación con los sus respectivos grupos comparativos (H2015, H2016 y M2016) como se muestra en la tabla 5. Asimismo, se normalizó la frecuencia de las variables (columnas 6, 7 y 8 de la tabla 5) para permitir una comparación equitativa entre regiones genómicas con diferentes longitudes al ajustar la cantidad de las variables en función al tamaño de cada gen. En este análisis se consideraron como diferencias relevantes aquellas superiores a una frecuencia > 0.005 (marcadas de color naranja). Como se puede observar en la tabla 5, el mayor número de diferencias están entre las secuencias de los grupos de humanos del 2015 y 2016 en los genes M, en las secuencias correspondientes a NS2B y NS4A. Mientras que al comparar los grupos humanos 2016 contra el grupo mosquito 2016 solo se identificó una diferencia relevante en el gen pr/M. Entre los grupos humanos 2015 y mosquito 2016 no se observaron diferencias relevantes.

Tabla 5. Comparación de los SNPs diferenciales por gen entre los tres grupos de secuencias del ZIKV en el continente americano

Gen	Longitud de la secuencia	Variante H2015-H2016	Variante H2015-M2016	Variante H2016 - M2016	Freq.norm. variantes H2015-H2016	Freq.norm. H2015-M2016	Freq.nor. H2016 - M2016
C	311	1	0	0	0.0032	0	0
Pr	278	1	1	2	0.0036	0.0036	0.0071
M	224	2	0	0	0.0089	0	0
E	1511	3	3	6	0.0019	0.0019	0.0039
NS1	1055	4	4	4	0.0038	0.0038	0.0038
NS2A	677	7	0	2	0.0010	0	0.0025
NS2B	389	2	0	0	0.0051	0	0
NS3	1850	4	4	6	0.0021	0.0021	0.0032
NS4A	380	3	1	1	0.0079	0.0026	0.0026
NS4B	752	1	0	2	0.0013	0	0.0026
NS5	2708	4	7	9	0.0014	0.0025	0.0032

Las variantes con una frecuencia > 0.005 detectadas al comparar los grupos: H2015 (ZIKV humano, 2015), H2016 (ZIKV humano, 2016) y M2016 (ZIKV mosquito, 2016) se muestran en color naranja para facilitar su identificación.

Obtención del transcriptoma de las células infectadas con las tres cepas del ZIKV

Como se observó anteriormente en el análisis comparativo del genoma de los tres grupos de secuencias de ZIKV, existen diferencias en distintas posiciones del genoma, por lo tanto, buscamos determinar si existen diferencias en el perfil transcriptómico del ZIKV. Por consiguiente, se eligió la línea celular C6/36, proveniente de mosquitos *Ae. Albopictus*, las cuales se infectaron por 24 h a una MOI de 1 con las cepas ZIKV OAX (recolectada en el estado de Oaxaca en humano en el año 2016), PR (recolectada en Puerto Rico en el año 2015) y 31N (recolectada de larvas de mosquito en estado de Morelos en el año 2016). Estas cepas están

relacionadas con los tres grupos de secuencias analizadas anteriormente: humano 2016, humano 2015 y mosquito 2016.

Posteriormente, se colectaron las células no infectadas e infectadas, se extrajo el RNA total y se eliminaron los RNA ribosomales y se enviaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) para llevar a cabo la de la secuenciación masiva, RNAseq (shotgun) mediante la tecnología illumina.

Evaluación de calidad de las secuencias

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación masiva RNAseq se procesaron las secuencias sin adaptadores en formato FASTQ para realizar la evaluación de la calidad de dichas secuencias mediante el software FASTQC. De manera consistente se observó que la calidad en el último nucleótido era baja como se ejemplifica en la Figura 8 para una de las muestras (posición 76 de la gráfica).

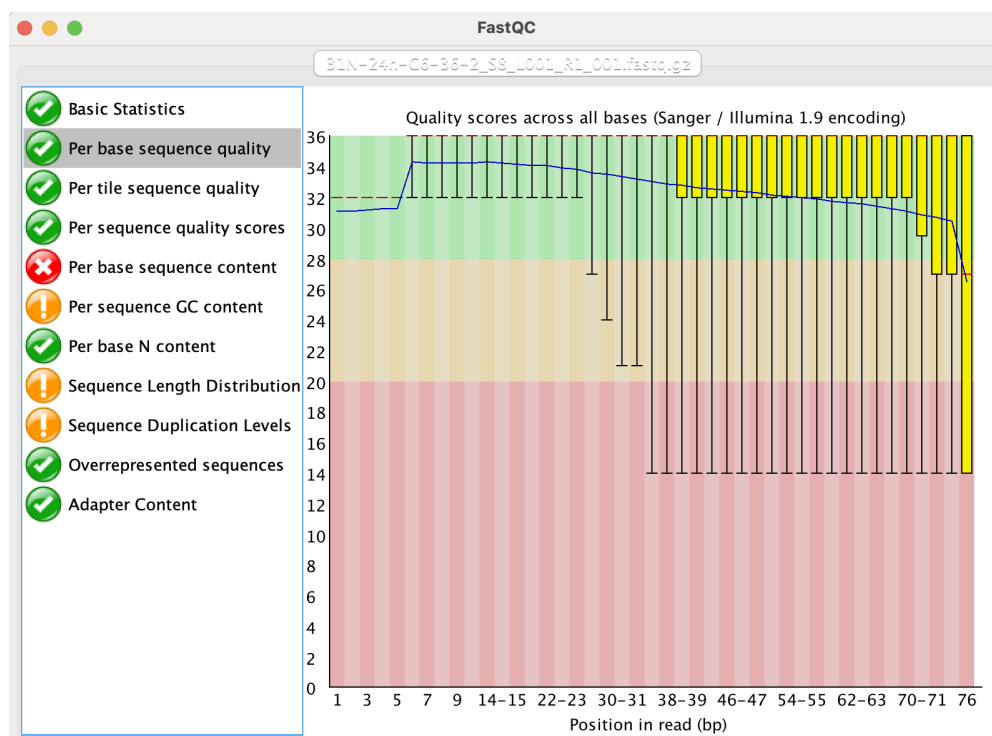


Figura 8. Evaluación de la calidad de las secuencias. Los archivos obtenidos después de realizar la técnica de secuenciación masiva por illumina fueron analizados y evaluados usando la herramienta FASTQC. El eje X representa la posición de cada base, mientras que en el eje Y representa la puntuación de la calidad de cada base (en una escala de Phred). Imagen representativa de la calidad de la muestra 31N a las 24 h postinfección.

Limpieza de las secuencias

Para evitar errores en los siguientes análisis se eliminaron los nucleótidos con mala calidad de todas las secuencias utilizando la herramienta Trimmomatic. Una vez recortados los nucleótidos de mala calidad se evaluó de nuevo la calidad de las secuencias con FASTQC, observando una mejora en los scores de calidad, aunque hubo una disminución en la longitud total de las lecturas, como se muestra en la tabla 6. La calidad de los nucleótidos de cada secuencia presentó una puntuación óptima, confirmando que los nucleótidos de mala calidad habían sido eliminados de manera eficiente.

Tabla 6. Comparación de la longitud del total de las lecturas pareadas (R1 y R2) de las células infectadas con las tres cepas del ZIKV antes y después de ser procesadas

	Muestra	Número total de lecturas crudas	Número total de lecturas limpias
Células no infectadas 1	R1	36092505	36028208
	R2	36092505	36068208
Células no infectadas 2	R1	42982572	42954190
	R2	42982572	42954190
PR	R1	36096616	36072987
	R2	36096616	36072987
PR2	R1	45540542	45510095
	R2	45540542	45510095
OAX	R1	34633877	34611139
	R2	34633877	34611139
OAX2	R1	35071236	35048464
	R2	35070636	35048464
31N	R1	53692616	53657887
	R2	53692616	53657887

31N2	R1	52742433	52734427
	R2	52427895	52393743

Mapeo de las secuencias a un genoma de referencia y conteo de lecturas por gen.

Una vez confirmada la óptima calidad de las secuencias fueron mapeadas contra el genoma de referencia del mosquito *Ae. albopictus* GCF_002204515.2 utilizando el programa STAR, los archivos BAM fueron procesados mediante el programa FeatureCounts para cuantificar las lecturas obtenidas según su condición experimental. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Número total de lecturas por muestra

Nombre la muestra	Total de lecturas mapeadas
Células no infectadas 1	11,615,989
Células no infectadas 2	14,146,905
OAX	11,768,129
OAX2	12,125,275
PR	11,829,375
PR2	14,716,366
31N	18,013,126
31N2	17,334,123

Como se puede observar en la figura 9, el tamaño de las lecturas mapeadas de las muestras mock (células no infectadas) y OAX es similar, además se aprecia una diferencia muy pequeña entre réplicas biológicas. En esta misma figura se observa que las réplicas biológicas de la muestra PR tenían una mayor variabilidad y las muestras de la infección con la cepa 31N contaban con un mayor número de lecturas mapeadas en comparación con las otras muestras.

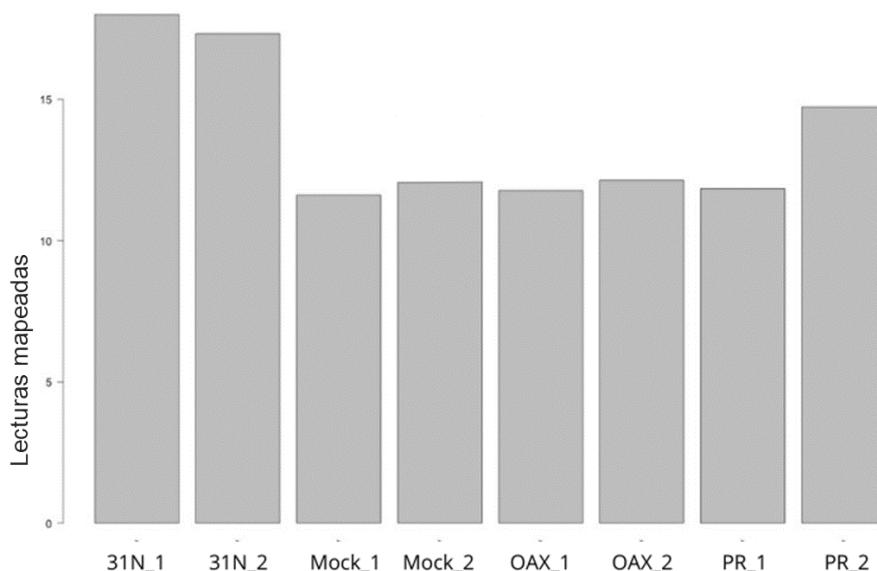


Figura 9. Total de lecturas mapeadas de las diferentes condiciones experimentales. Gráfica de barra donde se representa el total de lecturas mapeadas de cada muestra. En el eje X se encuentran los nombres de cada muestra, mientras que en el eje Y se encuentra el tamaño de las lecturas mapeadas.

Comparación de las lecturas mapeadas entre las muestras

Posteriormente se evaluó la similitud entre las lecturas mapeadas en las diferentes condiciones experimentales mediante una gráfica de escalamiento multidimensional que muestra las distancias entre cada muestra. En la figura 10 se observa en el eje X una distancia muy corta entre los perfiles de expresión génica de las muestras 31N, PR réplica 2 y mock, indicando una similitud entre las muestras. Mientras que las muestras infectadas con la cepa OAX y PR réplica 1 mostraron una mayor distancia en relación a la muestra mock reflejando una mayor diferencia en los perfiles de expresión génica. En el eje Y de la gráfica se sigue observando una similitud en las muestras 31N, PR réplica 2 y mock. Es importante mencionar que se observó una mayor diferencia en el perfil de expresión génica de las muestras OAX y PR réplica 1 con respecto a mock.

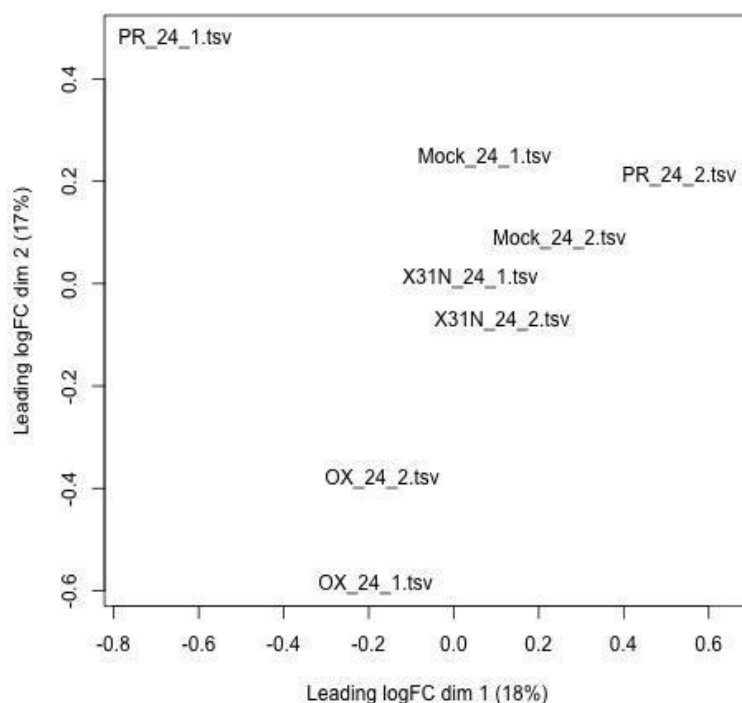


Figura 10. Distribución de las muestras de las células no infectadas e infectadas con ZIKV según sus perfiles de expresión génica. Escalamiento multidimensional de las distancias euclidianas construidas a partir de las lecturas mapeadas.

Nivel de expresión génica de las muestras

En la figura 11a, se muestran con mapas de calor los perfiles de expresión génica de las células no infectadas y de las infectadas con la cepa OAX, junto con su réplica biológica, muestran un patrón parecido entre sí. Mientras que en el dendrograma vertical se puede observar que la mayoría de los transcritos tienen una gran similitud en el nivel de expresión y solo pocos muestran una mayor diferencia en expresión. En los incisos b) y c), se observa en los dendrogramas que las réplicas biológicas de las muestras 31N y OAX se agrupan entre sí, pero presentan variaciones en sus patrones de expresión. Mientras que, entre las dos diferentes condiciones experimentales, se observó una menor similitud. También entre las réplicas biológicas de la cepa PR se pudo observar una menor similitud. En el dendrograma vertical se observó una mayor diferencia entre los transcritos de la cepa OAX al ser comparados con la cepa 31N. Al comparar la cepa PR contra la cepa OAX se encontró una menor cantidad de transcritos expresados diferencialmente.

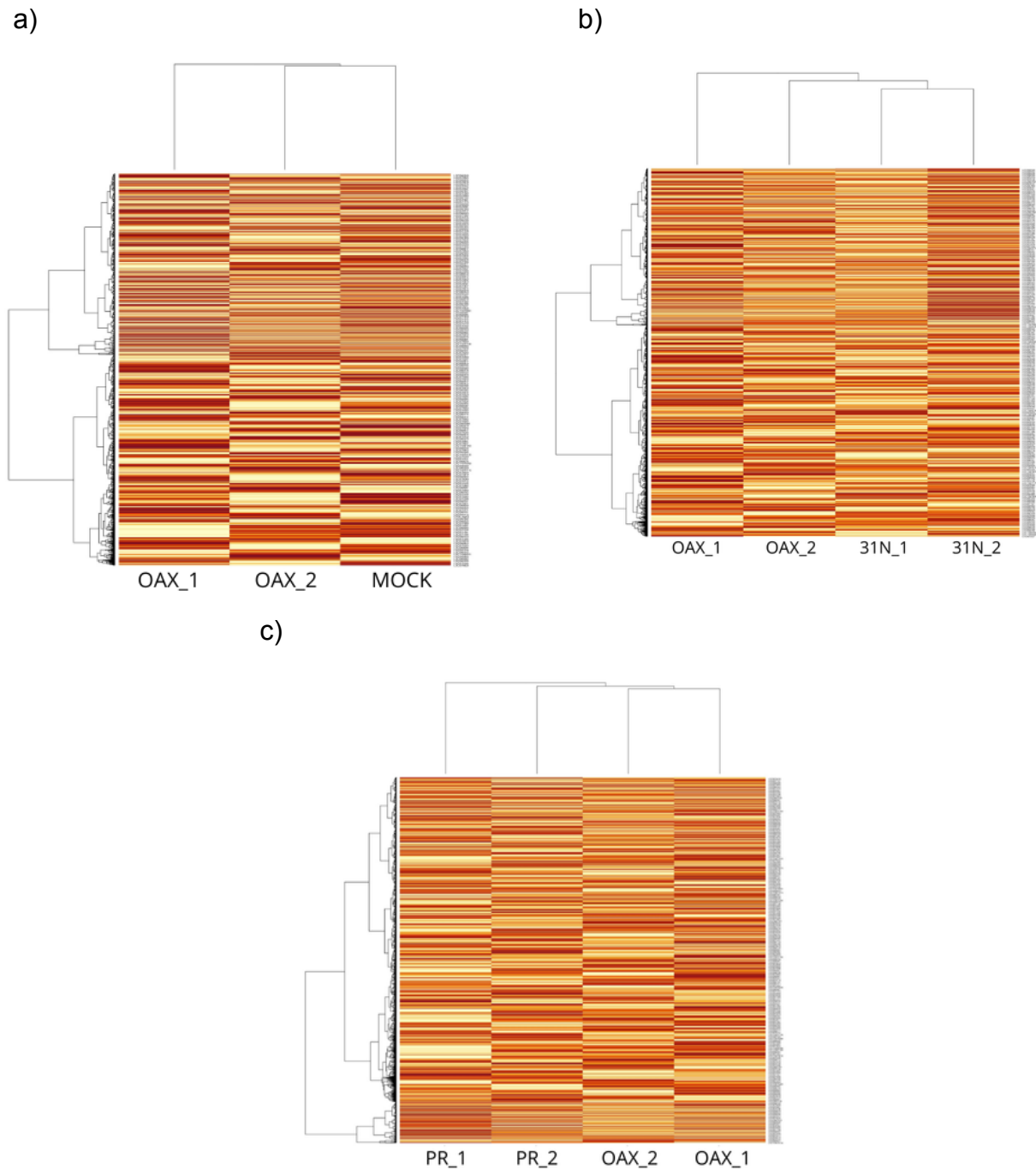


Figura 11. Análisis de agrupamiento jerárquico de la expresión de los transcritos de las células no infectadas e infectadas con ZIKV. Comparación de la expresión génica de células infectadas con diferentes cepas de ZIKV o sin infectar. Se muestran las comparaciones entre la cepa OAX contra mock (a), OAX contra 31N (b) y PR contra OAX (c) se usó para generar un mapa de calor usando la biblioteca edgeR en R. En la parte superior se muestra un dendrograma que muestra la similitud entre las muestras comparadas, mientras que los dendrogramas del lado izquierdo muestran las similitudes en el perfil de expresión de los transcritos.

Visualización y detección de los genes expresados diferencialmente en la infección con las tres cepas del ZIKV

Posteriormente mediante la paquetería Limma de R se identificaron los GED al comparar los transcriptomas de células C6/36 infectadas con las tres cepas del ZIKV, obteniendo los resultados que se representaron mediante gráficas de diferencias de medias como se muestra en las figuras 12, 13 y 14. Los GED se consideraron significativos cuando presentaban un valor $p < 0.05$. En las figuras 12, 13 y 14 cada punto corresponde a un gen, en color rojo se representan los genes sobre-expresados, mientras que los transcritos sub-expresados se encuentran de color azul. Los puntos suelen permanecer aglomerados en el centro de la gráfica simbolizando que estos genes no muestran diferencias en su expresión entre las muestras. Las líneas azules representan un umbral para identificar los GED significativos, considerados cuando la diferencia es mayor que $\log_2 > 1$ o $\log_2 < -1$, es decir que su cambio es dos veces mayor o la mitad de la expresión de un transcrito entre condiciones. Por lo cual los puntos más alejados del eje horizontal representan los transcritos con cambios mayores en la expresión, lo cual facilita la identificación de genes regulados diferencialmente. Al comparar las muestras OAX con respecto a Mock se identificaron 117 GED (anexo VII), entre las muestras 31N con respecto a OAX se identificaron 16 GED (anexo VIII) de los cuales 13 coinciden con los GED al comprar OAX con respecto a Mock (tabla 8). Por otro lado, en la muestra PR con respecto a OAX, aunque se observaron GED, sin embargo éstos no eran significativos, lo que podría sugerir una mayor similitud entre estas condiciones.

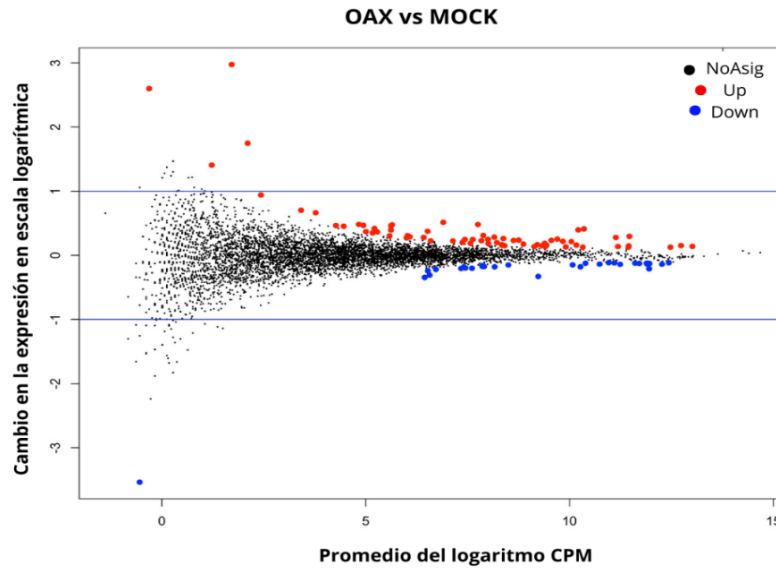


Figura 12. Visualización de los genes expresados diferencialmente al comparar la expresión génica de las células no infectadas e infectadas con la cepa OAX del ZIKV. Los GED de la cepa OAX, se identificaron y se visualizaron usando una biblioteca de R llamada Limma. En el eje X se muestra el promedio de la media logarítmica en cuentas por millón, mientras que en el eje Y se grafica la diferencia en la expresión de los transcritos entre condiciones.

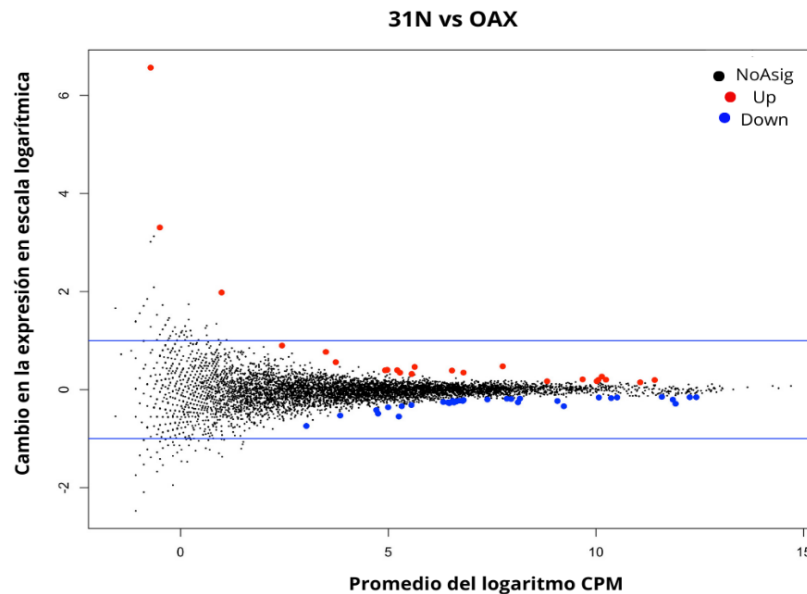


Figura 13. Visualización de los genes expresados diferencialmente al comparar la expresión génica de las células infectadas con la cepa 31N e infectadas con la cepa OAX del ZIKV. Los GED de la cepa 31N, se identificaron y se visualizaron usando una biblioteca de R llamada Limma. En el eje X se muestra el promedio de la media logarítmica en cuentas por millón, mientras que en el eje Y se grafica la diferencia en la expresión de los transcritos entre condiciones.

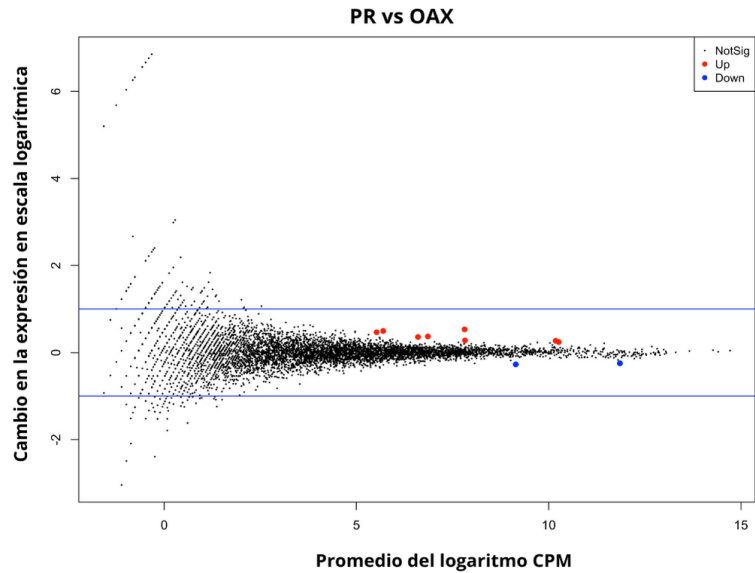


Figura 14. Visualización de los genes expresados diferencialmente al comparar la expresión génica de las células infectadas con la cepa PR e infectadas con la cepa OAX del ZIKV. Los GED de la cepa PR, se identificaron y se visualizaron usando una biblioteca de R llamada Limma. En el eje X se muestra el promedio de la media logarítmica cuentas por millón, mientras que en el eje Y se grafica la diferencia en la expresión de los transcritos entre condiciones.

Posteriormente usamos la librería Glimma en R, la cual nos permitió conocer el número de acceso en NCBI, el logCPM (cuentas por millón) y el valor de p de los 120 GED identificados anteriormente representados en las gráficas de las figuras 12, 13 y 14. Con dicha información y la recabada en NCBI se construyeron dos tablas, una que corresponde a las 117 GED (anexo VII) de las muestras OAX con respecto a Mock y otra de los 16 GED de las muestras 31N contra OAX (anexo VIII), de los cuales 13 se comparten con los encontrados en la infección con la cepa OAX (Tabla 8) y 3 que presentaron cambios solo en la muestra 31N contra OAX (Tabla 9). En el caso de la infección con ZIKV PR no se obtuvieron genes expresados específicamente con esta cepa que tuvieran diferencias estadísticamente significativas con respecto a las dos cepas anteriormente mencionadas, por lo que este grupo se omitió. Estos resultados podrían deberse a la similitud de los perfiles de expresión génica con las otras cepas o debido al umbral de significancia estadística muy estricto que descartó posibles candidatos.

Análisis de enriquecimiento de los términos de ontologías de genes GO

Los resultados del RNA-seq nos permitieron realizar un análisis de enriquecimiento para identificar las funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos, asociados a los GED obtenidos. Con dicho propósito se utilizaron los 120 GED al comparar las células infectadas con la cepa OAX contra las células no infectadas y las células infectadas con la cepa 31N con respecto a las células infectadas con la cepa OAX.

El análisis con base en los componentes celulares permitió identificar la asociación entre los GED y los siguientes elementos de la célula en descendente: los ribosomas, el complejo de proteosoma y ATP sintasa (Fig. 15); mientras que con respecto a las funciones moleculares se identificaron: el factor de alargamiento de la traducción, componentes estructurales del ribosoma y complejos ribonucleoproteicos (Fig.16). En el apartado de procesos biológicos asociados a los GED se identificaron: síntesis de compuestos organonitrogenados, metabolismo de péptidos, la traducción, síntesis y metabolismo de amidas (Fig. 17).

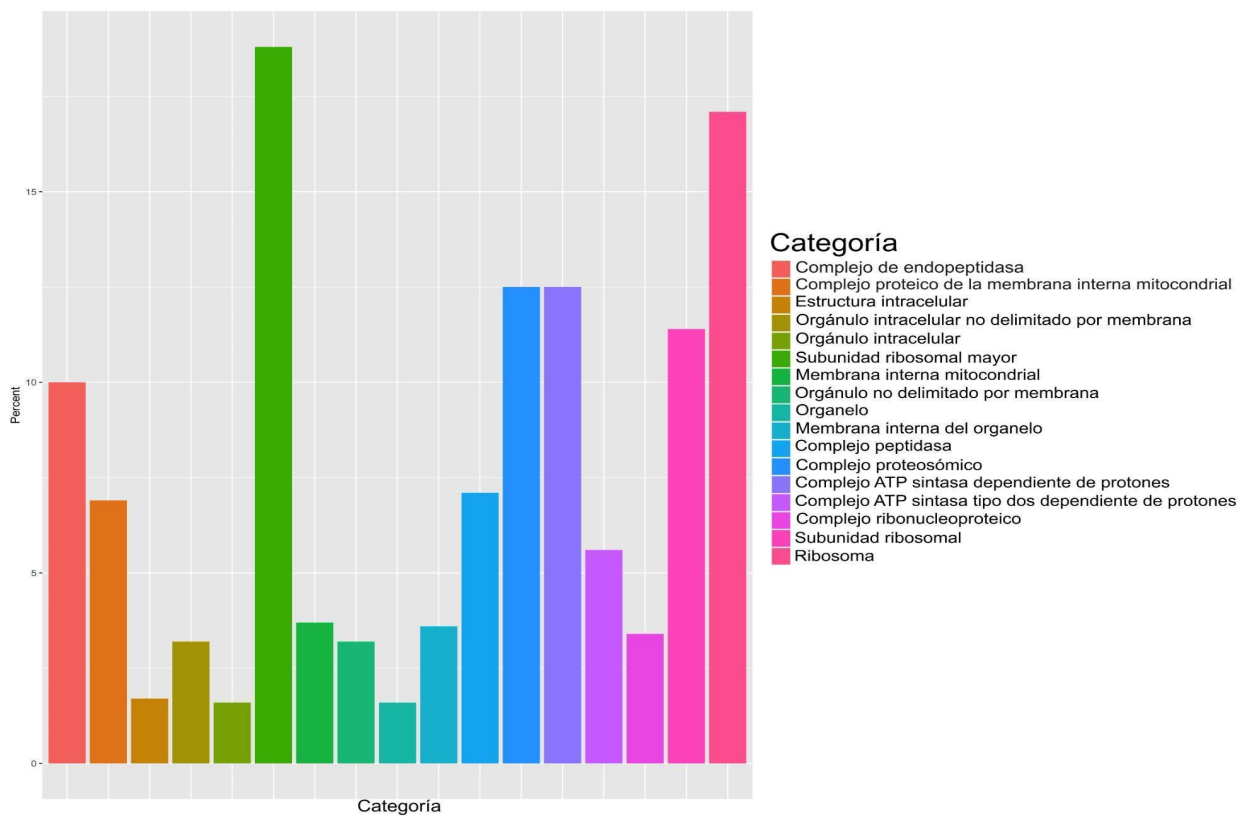


Figura 15. Componentes celulares vinculados a los GED en células C6/36 no infectadas contra células infectadas con ZIKV. Los GED se analizaron y clasificaron usando la herramienta de Gene Ontology de VectorBase. En el eje X se encuentran las categorías, mientras que en el eje Y grafica la cantidad de GED asociados a cada categoría.

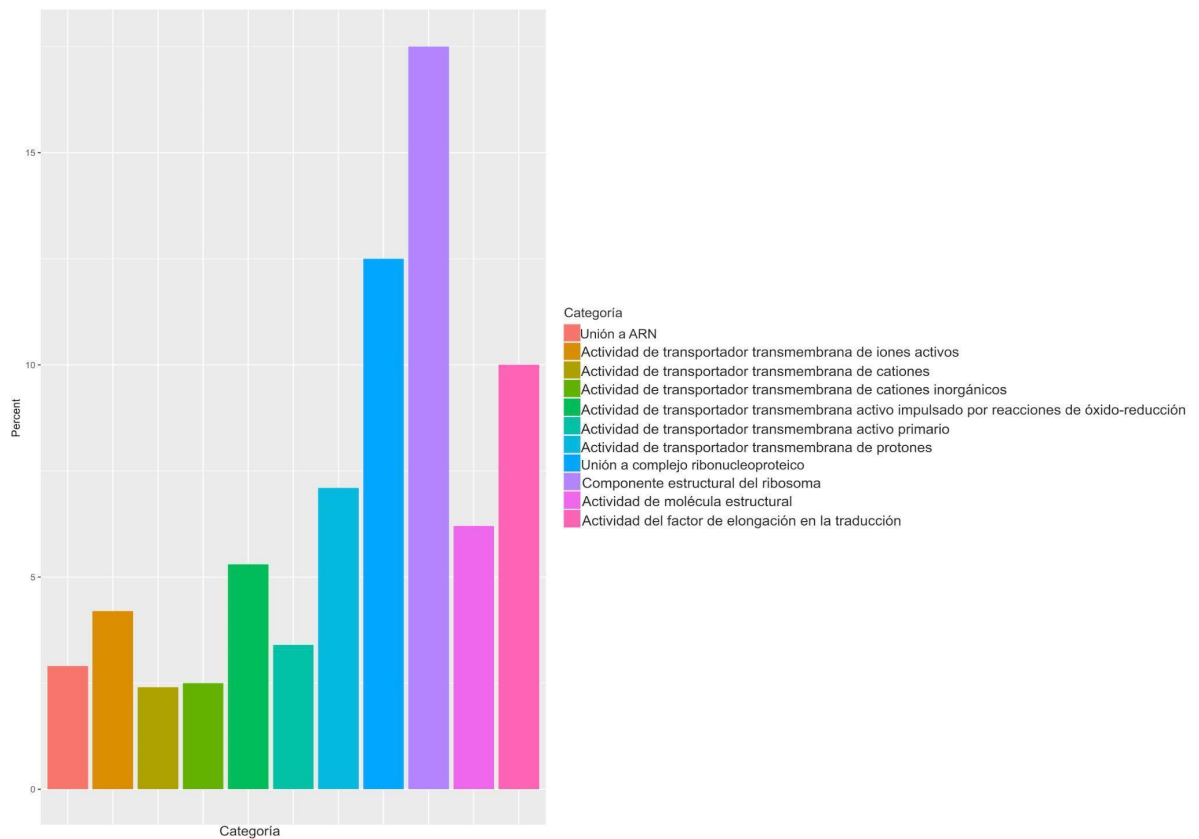


Figura 16. Funciones moleculares vinculadas a los GED en células C6/36 no infectadas contra células infectadas con ZIKV. Los GED se analizaron y clasificaron usando la herramienta de Gene Ontology de VectorBase. En el eje X se encuentran las categorías, mientras que en el eje Y grafica la cantidad de GED asociados a cada categoría.

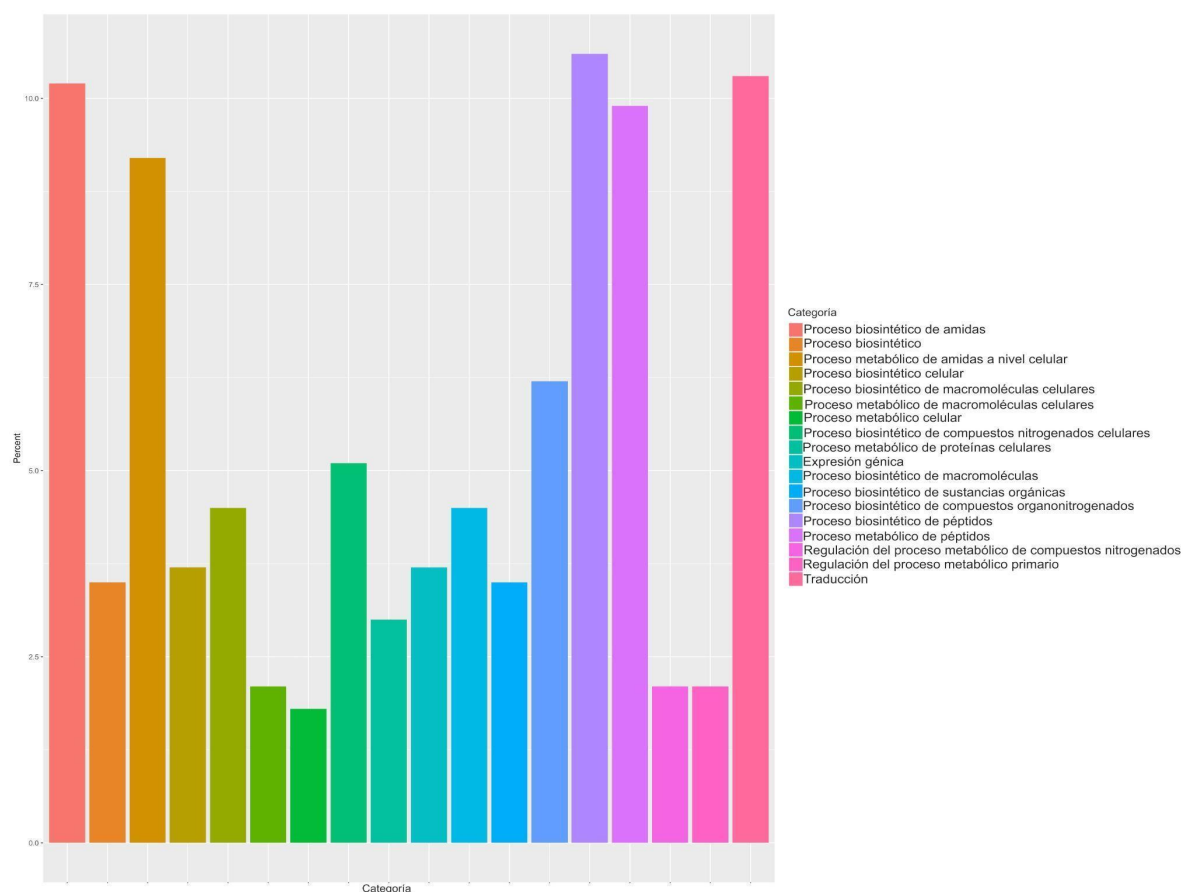


Figura 17. Procesos biológicos vinculados a los GED en células C6/36 no infectadas contra células infectadas con ZIKV. Los GED se analizaron y clasificaron usando la herramienta de Gene Ontology de VectorBase. En el eje X se encuentran las categorías, mientras que en el eje Y grafica la cantidad de GED asociados a cada categoría.

Análisis de transcritos diferencialmente expresados entre cepas del ZIKV

Los GED de las células infectadas con cada una de las tres cepas (OAX, 31N y PR) del ZIKV mostrados en los anexos VII y VIII se representan mediante un diagrama de venn y se organizaron conforme a la cepa con la cual se observaron diferencias en expresión (Fig. 18). El diagrama nos muestra que 13 GED (mostrados en la Tabla 8) de las células infectadas con las cepas 31N y OAX cambian su expresión. Mientras que 104 GED solo modificaron su expresión en la infección por la cepa OAX y 3 exclusivamente por la cepa 31N.

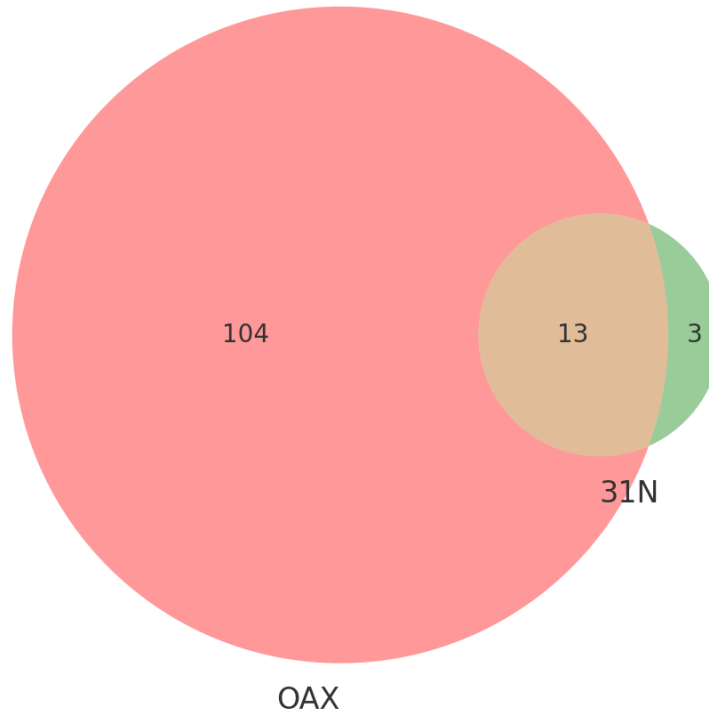


Figura 18. Representación de los GED al comparar el transcriptoma de las células C6/36 infectadas con ZIKV. El diagrama de Venn muestra el número de GED en células infectadas con ZIKV OAX (azul) a las 24 h y con ZIKV 31N (rosa), la intersección de ambos círculos nos muestra el número de GED que se comparte entre las dos cepas. El tamaño del círculo es proporcional al número de GED que representa.

Para continuar el proyecto nos enfocamos en los 13 GED en las infecciones con la cepa 31N y OAX cuando se comparan con las células no infectadas y en los 3 GED sólo en la infección con la cepa 31N, pero no con la cepa OAX. La expresión diferencial de estos transcritos nos podría indicar que los tres GED sólo con la cepa 31N tienen un papel importante en la infección en mosquitos y que los 13 GED compartidos entre OAX y 31N podrían ser importantes en la infección en humanos y mosquitos. En las tablas 8 y 9 se puede observar el listado de los genes mencionados, el valor de cambio o fold change (FC) cuando se comparan con las células no infectadas y el valor de p ($p \leq 0.05$), el cual nos indica que estos cambios son estadísticamente significativos. Los transcritos con expresión aumentada en la infección con 31N y OAX con respecto a los transcritos encontrados en las células no

infectadas (Tabla 8) son: LOC5571097, Proteína muscleblind, subunidad B tipo 2 de calcineurina (CanB2), factor eucariótico de inicio de la traducción 4H (eIF4H), proteína scylla, Proteína E1 con dominio de choque frío (CSDE1), Miembro B de la familia de las fosfoproteínas nucleares 32 ricas en leucina ácida, profilina y chaperona de cobre para superóxido dismutasa. Por otro lado, los transcritos con expresión disminuida en la infección con ambas cepas con respecto a las células no infectadas son: Proteína ribosomal L38 de la subunidad 60S, subunidad de ferritina, LOC5565553, Proteína ribosomal S29 de la subunidad 40S. En la tabla 9 se pueden observar los tres transcritos que son expresados diferencialmente sólo en la infección con la cepa 31N uno de los cuales es el cotransportador putativo de fosfato inorgánico que está sobreexpresado ($FC \geq 1$) ; así como los dos disminuidos ($FC \leq 1$) que son la proteína putativa de saliva y la homóloga de la subunidad TOMM7 del receptor de importación mitocondrial.

Tabla 8. Genes expresados diferencialmente en la infección con las cepas OAX y 31N de ZIKV con respecto a las células no infectadas

Símbolo NCBI	FC 31N vs OAX (valor de p)	FC OAX vs Mock (valor de p)	Nombre del RNAm	Función
LOC5571097	3.0304 (0.0007864)	3.0074 (8.731E-19)	No caracterizado	No caracterizada.
LOC5571120	2.9471 (0.01537)	2.9154 (0.00003634)	Proteína muscleblind	Regula el empalme de RNAm, el desarrollo de los músculos y del sistema nervioso (Bargiela et al., 2019).
LOC5573370	2.5038 (0.01227)	2.3637 (0.000009488)	Subunidad B tipo 2 de calcineurina (CanB2).	Regulador de la fosforilación para completar la meiosis en Drosophila. (Krauchunas et al., 2013).

LOC5563960	2.2573 (0.01537)	3.2688 (0.000000000 00005657)	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4H	Pertenece al complejo de preinicio de la traducción 43s. Facilita el reclutamiento del RNAm al recircular su estructura y estabilizarla para facilitar la unión del complejo (Feng et al., 2005).
LOC5569968	2.4986 (0.0537)	1.8672 (7.727E-32)	Proteína Scylla	Inhibe el crecimiento al reducir la actividad de S6K. Se induce en condiciones de hipoxia. (Reiling & Hafen, 2004).
LOC5572753	1.6599 (0.01437)	1.7910 (0.000000000 225)	Proteína E1 con dominio de choque frío (CSDE1)	Se une al RNA para modular la traducción, estabiliza el RNAm y regula la migración de células neuronales (Ciocia et al., 2024).
LOC23687632	1.6311 (0.01557)	2.5810 (9.452E-36)	Miembro B de la familia de las proteínas nucleares 32 ricas en leucina ácida	Proteína esencial para la replicación viral de la influenza aviar en células humanas. Al formar competentes de replicación (Staller et al., 2024).
LOC5577719	1.6047(0.01 437)	1.9696 (1.164E-27)	Profilin	Está involucrada en la dinámica del citoesqueleto y se ha observado que reduce la replicación viral

				del virus sincitial en células humanas al inhibir la maduración de los viriones (Butler-Cole et al., 2007).
LOC5576166	1.3477 (0.02282)	1.2989 (0.01314)	Chaperona de cobre para superóxido dismutasa	Transportador bidireccional de hierro de la membrana celular y catalizador de electrones a dióxígeno (Puchkova et al., 2021).
LOC5566522	0.6398 (0.02282)	0.7476 (0.00001453)	Proteína ribosomal L38 de la subunidad 60S	Componente de la subunidad 60S involucrada en la traducción de los RNAm. En <i>Drosophila melanogaster</i> se vinculó con la acumulación de espermatogonias en los testículos (Fang et al., 2024).
LOC5569124	0.5642(0.01537)	0.6603 (0.006072)	Subunidad de ferritina	Activador de la respuesta inmune humoral y de células antivirales. En ratones infectados con ZIKV presentaron una respuesta eficiente de anticuerpos ante el virus (Pattnaik et al., 2023).
LOC5565553	0.5269(0.01238)	0.5269 (5.671E-17)	No caracterizado	

LOC5569670	0.4648 (0.02198)	0.4691 (0.000000000 000002766)	Proteína ribosomal S29 de la subunidad 40S	Componente del ribosomal pequeño 40S. El silenciamiento de esta proteína en células C6/36 de Ae. Albopictus está vinculada con el aumento de viabilidad de las células ante la deltametrina que es un insecticida sintético (Sun et al., 2011).
------------	---------------------	--------------------------------------	---	---

Tabla 9. GED en la infección con la cepa 31N con respecto a la cepa OAX

Símbolo NCBI	FC 31N vs mock (valor de p)	Nombre del RNAm	Función
LOC5568583	1.6121 (0.01557)	Posible cotransportador de fosfato inorgánico.	No caracterizada.
LOC5571086	0.6003 (0.02198)	Proteína putativa de saliva.	No caracterizada.
LOC5572173	0.2884 (0.01537)	Homólogo de la subunidad TOMM7 del receptor de importación mitocondrial.	Pertenece a la subunidad pequeña del complejo TOM encargado de ingresar proteínas producidas en el citoplasma a la mitocondria. TOMM7 puede inhibir la replicación del CHIKV en células Huh7 al fortalecer el funcionamiento de la mitocondria fundamental para producir una respuesta inmune (Sakaguchi et al., 2020).

La siguiente etapa de este trabajo consistió en determinar la abundancia de los tres transcritos expresados diferencialmente en las células infectadas con la cepa 31N con respecto a OAX pero ahora mediante un ensayo de RT-qPCR específico para amplificar dichos RNAm. Así, se diseñaron iniciadores para los tres transcritos expresados sólo en 31N; en el caso del co-transportador de fosfato inorgánico putativo y del péptido secretado de saliva putativo se logró estandarizar las condiciones de amplificación en punto final con los extractos de RNA total de células C6/36 sin embargo los resultados no mostraron diferencias de expresión entre las células no infectadas y las infectadas con dicha cepa (Fig. 19). En el caso de TOMM7, los iniciadores diseñados no amplificaron este transcrito en ninguna de las condiciones probadas por lo que no continuamos el estudio con este RNAm, sin embargo, como perspectiva de este trabajo, se podrían diseñar otros iniciadores que permitan determinar si existen cambios de expresión de este transcrito sólo en la infección con la cepa 31N.

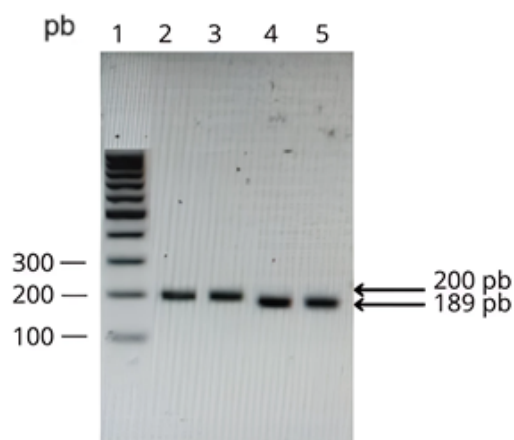


Figura 19. Detección de la expresión del RNAm de la proteína putativa de saliva y del cotransportador de fosfato inorgánico putativo a partir de células C6/36 a las 24 h post infección. Los extractos de RNA de células C6/36 no infectadas (carriles 2 y 4) e infectadas con la cepa 31N (carriles 3 y 5) se utilizaron para amplificar el RNAm de la proteína putativa de saliva (carriles 2-3) y del cotransportador de fosfato inorgánico putativo (carriles 4-5). En el carril 1 se separaron los marcadores de tamaño molecular que corresponden a la escalera de 100 bp (Thermo Fisher). La flecha indica la banda de los amplicones detectados correspondientes para el cotransportador de fosfato inorgánico putativo de 189 pb y la proteína putativa de saliva de 200 pb.

En vista de los resultados anteriores, se procedió a seleccionar transcritos de los que se expresaron diferencialmente en la infección de las células C6/36 con la cepa 31N

y OAX de ZIKV con respecto a las células no infectadas. De tal manera que después de analizar los transcritos incluidos en la tabla 8 decidimos enfocarnos particularmente en el RNAm de Scylla pues se ha reportado que esta proteína puede participar en eventos en los que las células se encuentran estresadas como en condiciones de hipoxia en *Drosophila* y en humanos, por lo que podría estar participando en hacer frente al estrés ocasionado por la infección con ZIKV en el mosquito (Reiling & Hafen, 2004).

Para determinar la expresión relativa del RNAm correspondiente a la proteína Scylla en la infección con las tres cepas del ZIKV, primero se diseñaron iniciadores a partir de los cuales se amplificó este transcrito cuyo amplicón es de 172 pb. Como se puede observar en la figura 20 se utilizó el extracto de RNA total de las células infectadas con ZIKV 31N con lo cual se obtuvo el amplicón en el tamaño esperado con una banda más prominente en las células infectadas a las 24 h post infección con respecto a las no infectadas. Este resultado nos permite continuar con la determinación de la abundancia de este RNAm en las células infectadas con las tres cepas de ZIKV y corroborar los resultados del RNA-seq.

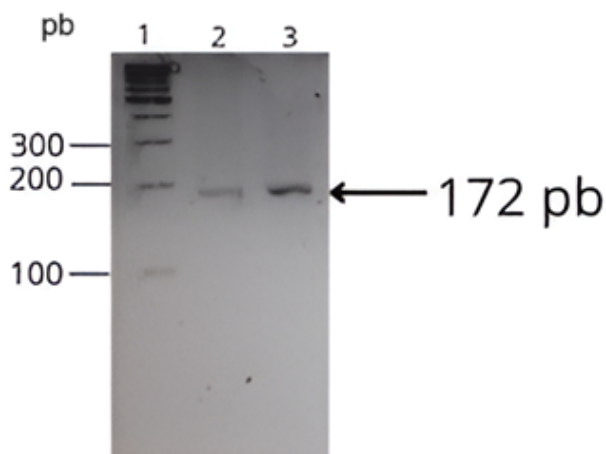


Figura 20. Detección de la expresión del RNAm de Scylla a partir de células C6/36 infectadas con el virus del zika. Los extractos de RNA de células C6/36 no infectadas (carril 2) y de las células infectadas con la cepa 31N a las 24 h post infección (carril 3) se utilizaron para amplificar el RNAm de Scylla. En el carril 1 se separaron los marcadores de tamaño molecular que corresponden a la escalera de 100 pb (Thermo Fisher). La flecha indica la banda del amplicón detectado correspondiente a 172 pb. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Determinación de la expresión del RNAm de Scylla en las células infectadas con las tres cepas del ZIKV

Los resultados anteriores sugieren que el RNAm de Scylla se encuentra expresado diferencialmente, al menos en células infectadas con la cepa 31N por lo que enseguida se procedió a realizar ensayos de RT-PCR en tiempo real para la determinación cuantitativa de la expresión del RNAm de Scylla en células infectadas con las tres cepas y compararlas con la expresión de este mensajero en células no infectadas. Como primer paso se verificó que los extractos de RNA de las células infectadas con las tres cepas del ZIKV tuvieran amplificación del RNA viral para confirmar que las células se encontraban infectadas, esto se hizo mediante la amplificación del RNA genómico de ZIKV usando iniciadores que amplifican una región de 240 nts que codifica para la proteína E del ZIKV. Como se puede observar en la figura 21, se obtuvo una banda del tamaño esperado sólo en las células infectadas. Los resultados nos indican que la infección con las tres cepas fue exitosa, sin embargo, en el caso de la cepa de OAX mostraba un mayor nivel de genoma viral con respecto a la infección con las otras dos cepas. Este resultado podría explicar la razón por la cual existen un mayor número de GED en la infección con la cepa de OAX.

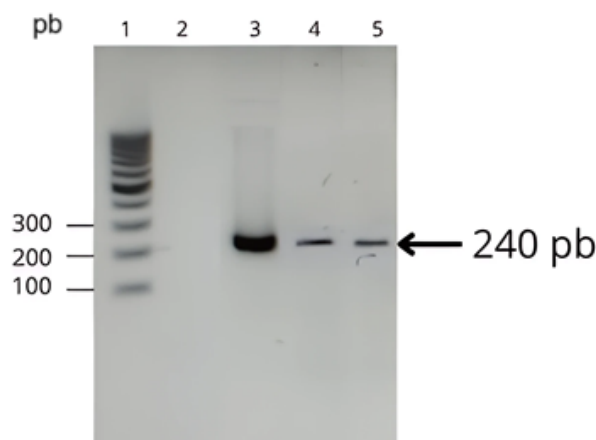


Figura 21. Detección del genoma del virus del zika a partir de células C6/36 a las 24 h post infección. Los extractos de RNA de células C6/36 no infectadas (carril 2) y de las células infectadas con la cepa OAX (carril 3), cepa 31N (carril 4) y cepa PR (carril 5) se utilizaron para amplificar el genoma de ZIKV. En el carril 1 se separaron los marcadores de tamaño molecular que corresponden a la escala de 100 bp (Thermo Fisher). La flecha indica la banda del amplicón detectado correspondiente a 240 pb. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Los ensayos de RT-qPCR para la amplificación del RNAm Scylla se llevaron a cabo a partir de extractos de RNA total de células no infectadas e infectadas con las tres cepas a las 24 h post infección usando como control de normalización la amplificación el RNAr S7. Los resultados de tres experimentos independientes y sus réplicas técnicas nos permitieron analizar la expresión de Scylla en la infección con ZIKV.

La cuantificación de la expresión del transcrito de interés se realizó usando la fórmula $2(-\Delta\Delta Ct)$ utilizando el valor de Ct (umbral de ciclo) obtenido en cada caso con respecto al control de normalización mencionados. Posteriormente se escribió un código para Python (anexo VI) para realizar el estudio estadístico T de Welch usando los valores $2(-\Delta\Delta Ct)$ de cuatro réplicas biológicas de las tres cepas del ZIKV para determinar si la diferencia entre los grupos respecto al grupo control no infectado resultaban estadísticamente significativas ($p \leq 0.0167$).

Como se puede observar en las figuras 22 y 23 se detectaron cambios significativos en la expresión del RNAm Scylla en las células infectadas con la cepa 31N del ZIKV con respecto a las muestras control no infectadas. En la muestra infectada con la cepa OAX 24 h y 48 h se observó una ligera tendencia al incremento (1.33 y 1.25 veces la expresión de las células no infectadas, respectivamente), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La infección de las células con la cepa 31N mostró una expresión mayor del RNAm Scylla con respecto a las células no infectadas a las 24 h y 48 h (1.86 y 2.99 veces la expresión de las células no infectadas, respectivamente). Cuando se usó la cepa PR en la infección se observó un aumento en la expresión de Scylla a las 24 h y 48 h post infección (1.61 y 1.91 veces la expresión de las células no infectadas, respectivamente). Cabe mencionar que en el caso de la infección con la cepa 31N a las 24 y 48 h post infección la diferencia en la expresión del RNAm de interés resultó estadísticamente significativa. Estos resultados demuestran que la expresión de Scylla aumenta principalmente en la infección con la cepa 31N.

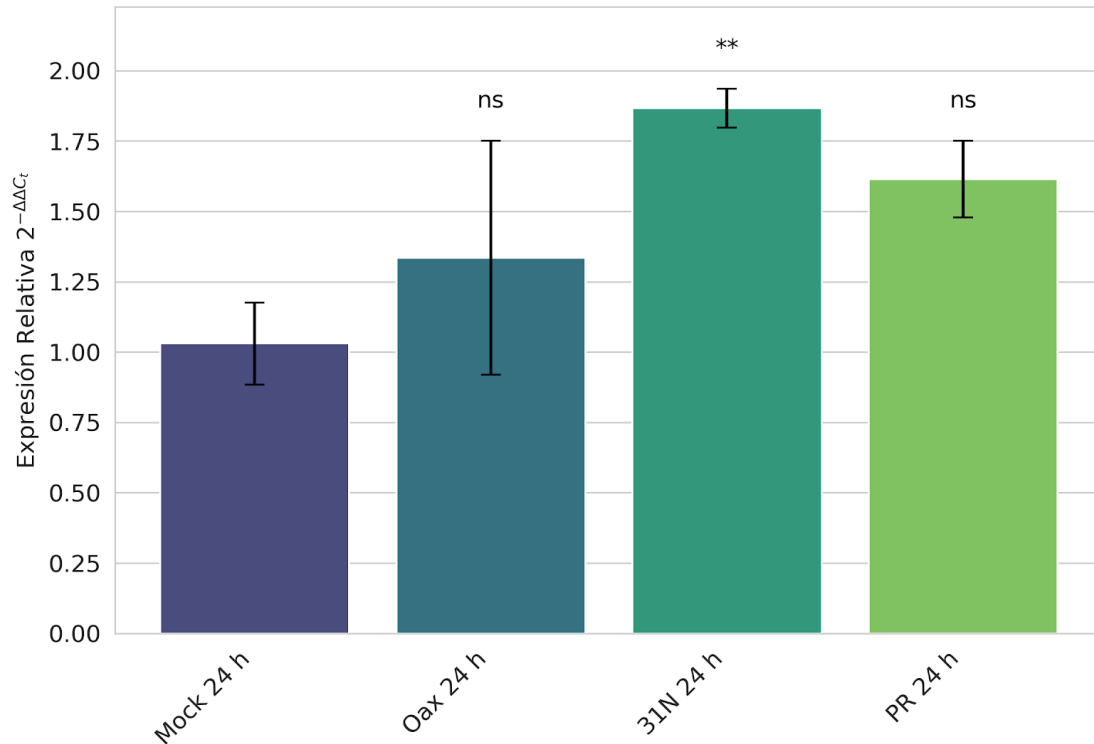


Figura 22. Determinación de los niveles de expresión del RNAm Scylla mediante RT-qPCR en células C6/36 infectadas con las tres cepas de ZIKV durante 24 h. Las células C6/36 se infectaron con tres cepas del ZIKV (OAX, 31N y PR) a una MOI de 1 por 24 h. El nivel de expresión relativa de Scylla se graficó en el eje Y. En el eje X se encuentra el nombre de la cepa y el tiempo post-infección. La expresión relativa se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ con los datos de tres experimentos independientes y normalizando los valores con la expresión del RNAr S7. Las comparaciones con un valor de $p \leq 0.0167$ (*), fueron consideradas significativas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada muestra.

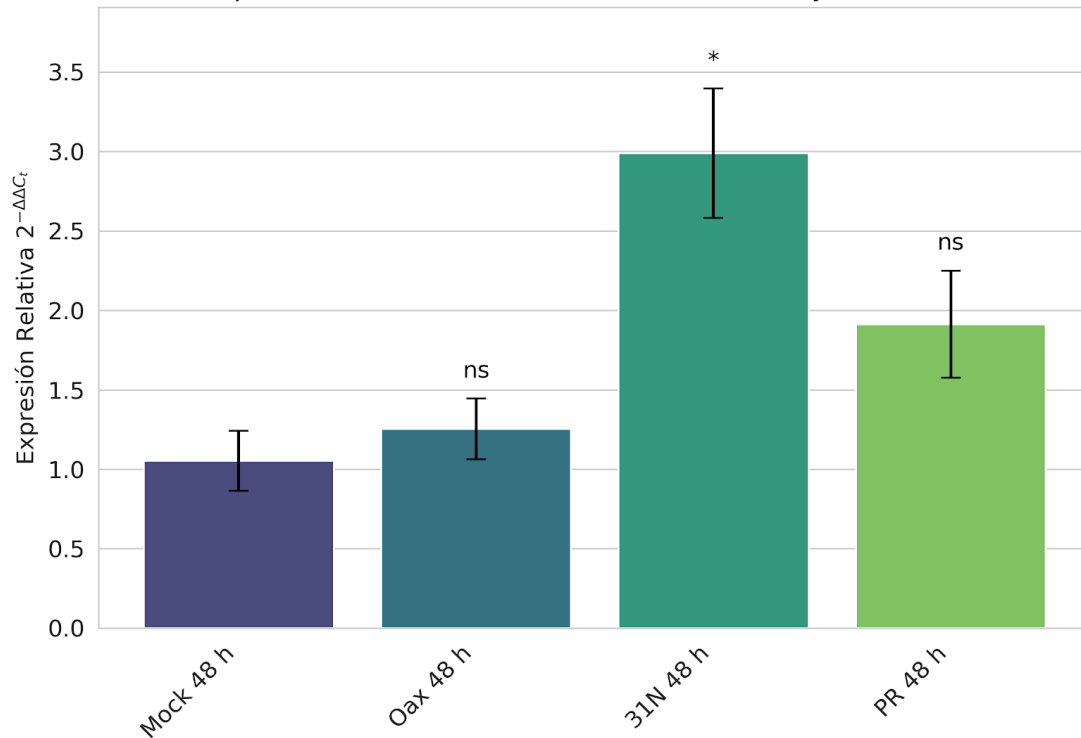


Figura 23. Determinación de los niveles de expresión del RNAm Scylla mediante RT-qPCR en células C6/36 infectadas con las tres cepas de ZIKV durante 48 h. Las células C6/36 se infectaron con tres cepas del ZIKV (OAX, 31N y PR) a una MOI de 1 a 48 h. El nivel de expresión relativa de Scylla se graficó en el eje Y En el eje X se encuentra el nombre de la cepa y el tiempo post-infección. La expresión relativa se calculó usando el método $2(-\Delta\Delta C_t)$ con los datos de tres experimentos independientes y normalizando los valores con la expresión del RNAr S7. Los datos con un valor de $p \leq 0.0167$ (*), fueron considerados significativos. Las barras de error representan la desviación estándar de cada muestra.

La proteína Scylla resulta de nuestro interés debido a que muestra una clara diferencia en expresión en células infectadas especialmente con la cepa 31N con respecto a las células no infectadas y una diferencia significativa con respecto a las otras dos cepas de los virus provenientes de humanos. Por ello, podría tratarse de una proteína que sea inducida de manera particular por el virus proveniente de mosquitos con respecto al de humanos. Es interesante que la diferencia entre los genomas se encuentre en la región de prM. La proteína Scylla ha sido poco estudiada, sin embargo, como se mencionó anteriormente, los artículos publicados han vinculado a esta proteína principalmente con la respuesta al estrés oxidativo o a hipoxia.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue identificar cambios en el transcriptoma de células C6/36 (*Aedes albopictus*) infectadas con diferentes cepas del ZIKV provenientes de humanos y mosquitos utilizando una línea celular C6/36. Antes de realizar el análisis de RNA-seq del transcriptoma buscamos identificar la existencia de variables genéticas en secuencias del ZIKV anteriormente notificadas, con la finalidad de anticipar posibles diferencias en el transcriptoma según su hospedero. Así, se recuperaron secuencias del ZIKV, aisladas de humanos (en los años 2015 y 2016) y mosquitos (2016) para ser analizadas mediante la herramienta Meta-CATS. Los resultados revelaron que al comparar los grupos de secuencias de humanos del 2015 y 2016, se encontraron polimorfismos diferenciales en los genes M, NS2B y NS4A. Estas proteínas virales se encuentran involucradas en la replicación viral, la activación de la vía apoptótica mitocondrial del hospedero y la actividad proteolítica de la proteína NS3 (Elliott & Mattapallil, 2024). Mientras que al comparar los grupos humanos 2016 contra el grupo mosquito 2016 solo se identificó una diferencia relevante en el gen de la proteína pr/M, esencial para producir partículas virales maduras y en su liberación de la célula por exocitosis (Tangudu et al., 2023). Entre los grupos humanos 2015 y mosquito 2016 no se observaron diferencias relevantes. Con base en estos resultados se pudo observar que la mayor cantidad de variantes génicas del ZIKV se presentaron a partir de que el virus infecta a humanos en el año 2016. Por otro lado, los resultados del análisis de RNA-seq nos permitieron determinar diferenciar entre el transcriptoma de las células no infectadas y el transcriptoma de las células infectadas con las cepas del ZIKV OAX (humano-2016), 31N (mosquito-2016) y PR (humano-2015).

En este trabajo se identificaron 117 GED (Anexo VII) en la infección con la cepa OAX con respecto a las células no infectadas. De estos 117 GED, 13 genes también estaban diferencialmente expresados en las células infectadas con la cepa 31N con respecto a las células no infectadas. Adicionalmente se identificaron 3 GED específicos de las células infectadas con la cepa 31N con respecto a las células no infectadas. Estos transcritos son: TOMM7 (LOC5572173) que se encontró sub-expresado; un posible cotransportador de fosfato inorgánico (LOC5568583) que

se encontró sobreexpresado y una proteína de saliva no caracterizada (LOC5571086) que se encontraba sub-expresada. TOMM7 codifica para una proteína también llamada TOM7 que forma parte del complejo de translocasas TOM de la membrana externa mitocondrial y está involucrada en la entrada a la mitocondria de pre-proteínas sintetizadas en el citoplasma (Pitt & Buchanan, 2021).

Con anterioridad se ha demostrado que los virus provocan daños en las mitocondrias, además en el artículo de Sakaguchi et al. (2020) observaron en células Huh7 infectadas con el virus del chikungunya que la sobreexpresión de TOMM7 inhibe la replicación del virus. En reportes previos se ha determinado que TOM7 puede desestabilizar el complejo translocasa (TOM) provocando la acumulación de pre-proteínas en la membrana externa de la mitocondria, asimismo se ha sugerido que TOM7 une a la proteína PINK1 en la membrana externa de la mitocondria con cual se ha asociado a la eliminación de las mitocondrias dañadas y patologías como la enfermedad del parkinson (Sekine et al., 2019). En este sentido, se ha demostrado que TOM7 es necesaria para el buen funcionamiento de la mitocondria e importante para que el hospedero monte una respuesta inmune innata eficiente; en este sentido se ha reportado que esta proteína es un regulador positivo de RIG-I, un conocido receptor de RNA intracelular que interviene en la respuesta antiviral (Zhou et al., 2019). La cepa 31N del ZIKV provoca cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune, metabolismo celular, mitofagia, lo cual podría ser utilizado para una mejor replicación viral.

Otro GED en las células C6/36 en respuesta a la infección del ZIKV fue el gen Scylla (LOC5569968) el cual se expresó 1.86 y 2.99 veces más en células infectadas con la cepa 31N con respecto a las células no infectadas, mientras que en las células infectadas con la cepa PR también se expresó 1.61 y 1.91 veces más, mientras que en la infección con la cepa OAX la diferencia resultó no significativa. Cabe señalar que este gen cuenta con un homólogo en mamíferos, llamado RTP801 o REDD1, el cual es un inhibidor de la vía mTOR, encargada de regular algunas funciones celulares como la proliferación, homeostasis y la autofagia (Kuss-Duerkop et al., 2017). En el artículo de Kuss-Duerkop et al (2017) determinaron que el gen REDD1 se encontraba sobreexpresado en células expuestas a condiciones como hipoxia o estrés oxidativo, provocando una disminución en la replicación del virus de la

influyen al desfosforilar AKT T308 (proteína serina-treonina cinasa que ayuda en la transferencia de señales celulares) clave para la activación de la vía mTORC1 involucrada en la actividad antiviral (Huynh et al., 2021). Sin embargo, la expresión prolongada de este gen se ha vinculado con la muerte celular y con enfermedades neurodegenerativas como huntington, parkinson y alzheimer (Pérez-Sisqués, et al., 2021b).

Por todo lo anterior, consideramos que *Scylla* podría sobreexpresar en nuestro estudio como respuesta al estrés oxidativo o hipoxia derivada de la infección del ZIKV.

Los análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes (GO) nos permitieron identificar las funciones moleculares, componentes celulares y mecanismos relacionados con los GED involucrados en el proceso de infección. Las categorías enriquecidas de F fueron el complejo proteasoma, los ribosomas y ATP sintasa, los cuales son complejos importantes en la síntesis de energía y la homeostasis de proteínas (Shore & Albert, 2022). Las funciones moleculares más enriquecidas fueron las de transportador transmembranal de cationes, la actividad del transportador transmembranal de protones y la función del factor de alargamiento en la traducción. Estas funciones están involucradas en la síntesis de energía, en su equilibrio y en la síntesis de proteínas. En la categoría de procesos biológicos, los más enriquecidos fueron la síntesis de amidas, la síntesis de compuestos organonitrogenados y la traducción. Todas las categorías antes mencionadas podrían estar asociadas a procesos celulares fundamentales para la replicación o traducción del ZIKV.

Adicionalmente, en el artículo de Ferreira et al. (2020) determinaron que el transcriptoma del intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti* infectados con el ZIKV, determinado a distintas temperaturas encontraron que 585 GED en los transcriptomas de los intestinos medios expuestos a 20°C a las 24 h post-infección, de los cuales 47 coincidían con los genes identificados en nuestro análisis (Anexo IX). Entre los GED reportados en ambos estudios se encontraron TOM7 con un FC de 2.0736 y la proteína de saliva no caracterizada con FC de 2.2997, ambos sobreexpresados, mientras que en nuestro estudio estos dos genes se encontraron

disminuidos con un FC de 0.2884 y 0.6003, respectivamente. En las mismas condiciones también se encontró el gen Scylla con un FC de 0.8225 (regulada a la baja), mientras que en nuestro estudio se encontró sobreexpresada con un FC de 2.4986 (tabla 8) en células infectadas con la cepa 31N y en las células infectadas con la cepa OAX un FC de 1.8672 (tabla 8), ambas respecto a las células no infectadas. Con base en estos datos se sugiere que la temperatura puede afectar la interacción de ZIKV-hospedero y que la modulación de dichos RNAm podría implicar funciones importantes para el ciclo replicativo viral.

Por último, en nuestro estudio se realizaron ensayos de RT-PCR para confirmar la expresión diferencial de algunos de los GED identificados. En el caso del co-transportador de fosfato inorgánico putativo y del péptido secretado de saliva putativo, aunque se lograron estandarizar las condiciones de amplificación, los resultados no mostraron diferencias de expresión entre las células no infectadas y las infectadas (Fig. 17). En el caso de TOMM7 los iniciadores diseñados no amplificaron este transcrito en ninguna de las condiciones probadas por lo que no continuamos el estudio con este RNAm, en contraste cuando se realizaron los ensayos con el RNAm de Scylla se observó una mayor expresión del gen Scylla en las células infectadas con la cepa 31N, OAX y PR a las 24 y 48 h post infección, siendo la infección con la cepa 31N la que promovió una mayor expresión de dicho gen. Estos resultados podrían sugerir que algunos transcritos se estarían regulando diferencialmente según la cepa que se esté analizando, produciendo una respuesta distinta en el transcriptoma de las células C6/36, lo cual podría promover cambios en el ciclo replicativo viral y en las consecuencias de la infección.

Estos resultados son útiles como información para desarrollar estrategias efectivas en el control y prevención del virus considerando contextos biológicos y hospederos. También se podrían desarrollar estrategias eficientes para contrarrestar las enfermedades neurodegenerativas vinculadas a la infección por ZIKV mediante la regulación de la expresión de la proteína Scylla o su homólogo en humanos RTP801.

Como perspectiva, se podrían evaluar las funciones de Scylla, TOMM7 y la proteína de saliva no caracterizada en la infección de ZIKV en células humanas y de

mosquitos, incluyendo un mayor número de cepas aisladas de ambos hospederos, con la finalidad de conocer sus efectos sobre la infección por ZIKV, y si es el caso, utilizar esta información en la elaboración de estrategias antivirales específicas para ambos hospederos.

CONCLUSIONES

El análisis transcriptómico de las células de mosquito infectadas con las cepas de ZIKV nos permitió aumentar nuestra comprensión acerca de la respuesta de las células a la interacción con distintas cepas de este virus. Los resultados nos revelaron diferencias en la expresión génica de las diferentes cepas analizadas implementadas en células de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36).

Los análisis realizados nos permitieron determinar que durante la infección por ZIKV los componentes celulares relacionados con la síntesis de energía y la homeostasis de proteínas cambian su expresión. Los procesos biológicos potencialmente relacionados con la infección por ZIKV son la síntesis de amidas, compuestos organonitrogenados y la traducción, posiblemente fundamentales para la replicación o traducción del virus. Lo anterior podría sugerir que el ZIKV promueve la modificación de las rutas celulares del hospedero para asegurar su supervivencia.

En este proyecto se identificaron ciertos GED como Scylla, el cual aumenta su expresión en la infección con las tres cepas, sin embargo el mayor cambio en expresión se registró con la cepa 31N. Estos resultados podrían indicar que la expresión de este gen es necesaria para una eficiente infección por el ZIKV especialmente con la cepa de mosquito.

Por otra parte, otros de los GED que también se identificaron en la cepa 31N con respecto a las células no infectadas fueron TOMM7 que se encontró sub-expresado, un posible cotransportador de fosfato inorgánico que se encontró sobreexpresado y una proteína de saliva no caracterizada que se encontraba sub-expresada. Genes asociados con procesos celulares relevantes, como la homeostasis mitocondrial, generación de señales de estrés, respuesta antioxidante, autofagia y la respuesta inmune. Por consiguiente, en futuras investigaciones se recomendaría tomar en cuenta estos genes para analizar sus funciones en el ciclo replicativo viral en mosquitos, pero también en humanos y determinar su papel como elementos que promuevan o limiten la infección por este virus. Lo anterior, nos permitirá desarrollar estrategias precisas para el control del virus y limitar el impacto en la salud humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
2. Bargiela, A., Sabater-Arcis, M., Espinosa-Espinosa, J., Zulaica, M., De Munain, A. L., & Artero, R. (2019). Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in in vitro and in vivo models. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 116(50), 25203-25213. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820297116>
3. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
4. Butler-Cole, C., Wagner, M. J., Da Silva, M., Brown, G. D., Burke, R. D., & Upton, C. (2007). An ectromelia virus profilin homolog interacts with cellular tropomyosin and viral A-type inclusion protein. *Virology Journal*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1743-422x-4-76>
5. BV-BRC. (s. f.). Metadata-Driven Comparative Analysis Tool (Meta-CATS). <https://www.bv-brc.org/view/MetaCATS>
6. Canal, M., Romaní-Aumedes, J., Martínez-Flores, N., Pérez-Fernández, V., & Malagelada, C. (2014). RTP801/REDD1: a stress coping regulator that turns into a troublemaker in neurodegenerative disorders. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00313>.
7. Cánovas, R., Moffat, A., & Turpin, A. (2016). CSAM: Compressed SAM format. *Bioinformatics*, 32(24), 3709-3716. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw543>
8. Centers for Disease Control and Prevention. (2024, March 12). *Life cycle of Aedes mosquitoes*. U.S. Department of Health & Human Services. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycle-of-aedes-mosquitoes.html>
9. Chen, Y., Chen, L., Lun, A. T. L., Baldoni, P. L., & Smyth, G. K. (2025). edgeR v4: Powerful differential analysis of sequencing data with expanded

- functionality and improved support for small counts and larger datasets. *Nucleic acids research*, 53(2), gkaf018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf018>.
10. Chen, H., & Boutros, P. C. (2011). VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-35>
 11. Ciocia, A., Mestre-Farràs, N., Vicent-Nacht, I., Guitart, T., & Gebauer, F. (2024). CSDE1: a versatile regulator of gene expression in cancer. *NAR Cancer*, 6(2). <https://doi.org/10.1093/narcan/zcae014>
 12. Davey, A. (2024, octubre 28). *How-to: NGS quality control*. *Front Line Genomics*. <https://frontlinegenomics.com/how-to-ngs-quality-control/>
 13. De Sena Brandine, G., & Smith, A. D. (2019). Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research*, 8, 1874. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21142.1>.
 14. Deshpande, A., Sant'Anna, I., Cunha, L., Backer, H., & Flores, H. (2024). *Neochloris aquatica induces larval mortality, molting defects, and unstable flightless adults in the Asian tiger mosquito*. *Journal of Invertebrate Pathology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(23\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(23)00158-1)
 15. Diboun, I., Wernisch, L., Orengo, C. A., & Koltzenburg, M. (2006). Microarray analysis after RNA amplification can detect pronounced differences in gene expression using limma. *BMC Genomics*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-252>.
 16. Dobin, A., & Gingeras, T. (2013). Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current Protocols In Bioinformatics*, 51(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1114s51>.
 17. Etebari, K., Hegde, S., Saldaña, M. A., Widen, S. G., Wood, T. G., Asgari, S., & Hughes, G. L. (2017). Global Transcriptome Analysis of *Aedes aegypti* Mosquitoes in Response to Zika Virus Infection. *mSphere*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00456-17>.
 18. European Molecular Biology Laboratory. (2024). *Functional genomics II: Common technologies and data analysis methods*. EMBL-EBI. Recuperado 27 de enero de 2025, de <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-ii-common-te>

chnologies-and-data-analysis-methods/rna-sequencing/performing-a-rna-seq-experiment/data-analysis/differential-gene-expression-analysis/

19. Evans, C., Hardin, J., & Stoebel, D. M. (2017). Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Briefings In Bioinformatics*, 19(5), 776-792. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx008>.
20. Fang, Y., Zhang, F., Zhao, F., Wang, J., Cheng, X., Ye, F., He, J., Zhao, L., & Su, Y. (2024). RpL38 modulates germ cell differentiation by controlling Bam expression in *Drosophila* testis. *Science China Life Sciences*, 67(11), 2411-2425. <https://doi.org/10.1007/s11427-024-2646-3>
21. Feng, P., Everly, D. N., & Read, G. S. (2005). mRNA Decay during Herpes Simplex Virus (HSV) Infections: Protein-Protein Interactions Involving the HSV Virion Host Shutoff Protein and Translation Factors eIF4H and eIF4A. *Journal Of Virology*, 79(15), 9651-9664. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.9651-9664.2005>
22. Ferreira, P. G., Tesla, B., Horácio, E. C. A., Nahum, L. A., Brindley, M. A., De Oliveira Mendes, T. A., & Murdock, C. C. (2020). Temperature Dramatically Shapes Mosquito Gene Expression With Consequences for Mosquito–Zika Virus Interactions. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00901>.
23. Gallardo, I. F. B., Camacho, M. E. I., Robles, L. I. V., Celis, A. C., & Partida, A. H. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*, 15(1), 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2015.06.002>.
24. Geijtenbeek, T. B., Dunnen, J. D., & Gringhuis, S. I. (2009). Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiology*, 4(7), 879-890. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.51>
25. Gachon, F., Gaudray, G., Thébault, S., Basbous, J., Koffi, J. A., Devaux, C., & Mesnard, J. (2001). The cAMP response element binding protein-2 (CREB-2) can interact with the C/EBP-homologous protein (CHOP). *FEBS Letters*, 502(1-2), 57-62. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02646-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02646-1).
26. Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges.

- Biotechniques/BioTechniques*, 56(2), 61-77.
<https://doi.org/10.2144/000114133>.
27. Hung, S., & Huang, S. (2021). Contributions of Genetic Evolution to Zika Virus Emergence. *Frontiers In Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655065>
 28. Huynh, H., Levitz, R., Huang, R., & Kahn, J. S. (2021). mTOR kinase is a therapeutic target for respiratory syncytial virus and coronaviruses. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03814-7>
 29. Illumina, Inc. (2024.). *Considerations for RNA-Seq read length and coverage*. Illumina Knowledge Center. Recuperado el [2025], de <https://www.illumina.com/science/education/sequencing-coverage/read-length.html>
 30. Ji, F., & Sadreyev, R. I. (2018). RNA-Seq: Basic Bioinformatics Analysis. *Current Protocols In Molecular Biology (Online)*, 124(1).
<https://doi.org/10.1002/cpmb.68>.
 31. Jia, N., Jiang, Y., Jian, X., Cai, T., Liu, Q., Liu, Y., Xing, D., Dong, Y., Guo, X., & Zhao, T. (2023). Transcriptome Analysis of Response to Zika Virus Infection in Two *Aedes albopictus* Strains with Different Vector Competence. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(5), 4257.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054257>.
 32. Jin, H., Wan, Y., & Liu, Z. (2017). Comprehensive evaluation of RNA-seq quantification methods for linearity. *BMC Bioinformatics*, 18(S4).
<https://doi.org/10.1186/s12859-017-1526-y>.
 33. Jung, H. G., Cho, H., Kim, M., Jung, H., Bak, Y., Lee, S. Y., Seo, H. Y., Son, Y. M., Woo, H., Yoon, G., Kim, S. J., & Oh, J. W. (2022). Influence of Zika virus 3'-end sequence and nonstructural protein evolution on the viral replication competence and virulence. *Emerging microbes & infections*, 11(1), 2447–2465.
<https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2128433>
 34. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

35. Koch, C. M., Chiu, S., Akbarpour, M., Bharat, A., Ridge, K. M., Bartom, E. T., & Winter, D. R. (2018). A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, 59(2), 145-157. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0430tr>.
36. Krauchunas, A. R., Sackton, K. L., & Wolfner, M. F. (2013). Phospho-Regulation Pathways During Egg Activation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 195(1), 171-180. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.150110>
37. Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols (Online)*, 2015(11), pdb.top084970. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>.
38. Kumar, V., Garg, S., Gupta, L., Gupta, K., Diagne, C. T., Missé, D., Pompon, J., Kumar, S., & Saxena, V. (2021). Delineating the Role of *Aedes aegypti* ABC Transporter Gene Family during Mosquito Development and Arboviral Infection via Transcriptome Analyses. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1127. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091127>
39. Kuss-Duerkop, S. K., Wang, J., Mena, I., White, K., Metreveli, G., Sakthivel, R., Mata, M. A., Muñoz-Moreno, R., Chen, X., Krammer, F., Diamond, M. S., Chen, Z. J., García-Sastre, A., & Fontoura, B. M. A. (2017). Influenza virus differentially activates mTORC1 and mTORC2 signaling to maximize late stage replication. *PLoS Pathogens*, 13(9), e1006635. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006635>.
40. Law, C. W., Alhamdoosh, M., Su, S., Dong, X., Tian, L., Smyth, G. K., & Ritchie, M. E. (2016). RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Research*, 5, ISCB Comm J-1408. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9005.3>
41. Law, CW, Chen, Y., Shi, W. *et al.* voom: Las ponderaciones de precisión desbloquean herramientas de análisis de modelos lineales para el recuento de lecturas de ARN-seq. *Genome Biol* 15, R29 (2014). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
42. Lee, J., Kang, J., & Stipanuk, M. H. (2005). Differential regulation of glutamate–cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme

- formation in response to cysteine deprivation. *Biochemical Journal*, 393(1), 181-190. <https://doi.org/10.1042/bj20051111>.
43. Lee, W., Webster, J. A., Madzokere, E. T., Stephenson, E. B., & Herrero, L. J. (2019). Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasites & Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3433-8>
 44. Leggett, R. M., Ramirez-Gonzalez, R. H., Clavijo, B., Waite, D., & Davey, R. P. (2013). Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Frontiers In Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00288>
 45. Lescar, J., Luo, D., Xu, T., Sampath, A., Lim, S. P., Canard, B., & Vasudevan, S. G. (2008). *The NS2B–NS3 protease-helicase as a target for anti-dengue drug discovery*. *Antiviral Research*, 80(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.06.002>
 46. Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>.
 47. Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford. Print)*, 25(14), 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
 48. Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2013). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford. Print)*, 30(7), 923-930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
 49. Li, M., Zhou, Y., Cheng, J., Wang, Y., Lan, C., & Shen, Y. (2024). Response of the mosquito immune system and symbiotic bacteria to pathogen infection. *Parasites & Vectors*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06161-4>
 50. Malagelada, C., López-Toledano, M. A., Willett, R. T., Jin, Z. H., Shelanski, M. L., & Greene, L. A. (2011). RTP801/REDD1 Regulates the Timing of Cortical Neurogenesis and Neuron Migration. *Journal Of Neuroscience*, 31(9), 3186-3196. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4011-10.2011>.

51. Metsky, H. C., Matranga, C. B., Wohl, S., Schaffner, S. F., Freije, C. A., Winnicki, S. M., West, K., Qu, J., Baniecki, M. L., Gladden-Young, A., Lin, A. E., Tomkins-Tinch, C. H., Ye, S. H., Park, D. J., Luo, C. Y., Barnes, K. G., Shah, R. R., Chak, B., Barbosa-Lima, G. . . . Sabeti, P. C. (2017). Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*, 546(7658), 411-415. <https://doi.org/10.1038/nature22402>
52. Miller, M. B., & Tang, Y. W. (2009). Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Carolina Digital Repository (University Of North Carolina At Chapel Hill)*, 22, 611-633. <https://doi.org/10.17615/s13h-bt93>
53. Miller, S., & Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature Reviews Microbiology*, 6(5), 363–374. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1890>
54. Munger, S. C., Raghupathy, N., Choi, K., Simons, A. K., Gatti, D. M., Hinerfeld, D., Svenson, K. L., Keller, M. P., Attie, A. D., Hibbs, M. A., Graber, J. H., Chesler, E. J., & Churchill, G. A. (2014). RNA-Seq Alignment to Individualized Genomes Improves Transcript Abundance Estimates in Multiparent Populations. *Genetics*, 198(1), 59-73. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.165886>.
55. *NGS Workflow Steps* (2024) Illumina sequencing workflow. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>.
56. Oldham, M. C., Konopka, G., Iwamoto, K., Langfelder, P., Kato, T., Horvath, S., & Geschwind, D. H. (2008). Functional organization of the transcriptome in human brain. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1271-1282. <https://doi.org/10.1038/nn.2207>
57. Park, T., Kang, M., Baek, S., Lee, C. H., & Park, D. (2020). Zika virus infection differentially affects genome-wide transcription in neuronal cells and myeloid dendritic cells. *PLOS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231049>.
58. Pattnaik, A., Sahoo, B. R., Struble, L. R., Borgstahl, G. E. O., Zhou, Y., Franco, R., Barletta, R. G., Osorio, F. A., Petro, T. M., & Pattnaik, A. K. (2023). A

- Ferritin Nanoparticle-Based Zika Virus Vaccine Candidate Induces Robust Humoral and Cellular Immune Responses and Protects Mice from Lethal Virus Challenge. *Vaccines*, 11(4), 821. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040821>
59. Pease, J., & Sooknanan, R. (2012). A rapid, directional RNA-seq library preparation workflow for Illumina® sequencing. *Nature Methods*, 9(3). <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.355>.
 60. Pérez-Sisqués, L., Sancho-Balsells, A., Solana-Balaguer, J., Campoy-Campos, G., Vives-Isern, M., Soler-Palazón, F., Anglada-Huguet, M., López-Toledano, M., Mandelkow, E., Alberch, J., Giralt, A., & Malagelada, C. (2021). RTP801/REDD1 contributes to neuroinflammation severity and memory impairments in Alzheimer's disease. *Cell Death And Disease*, 12(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03899-y>.
 61. Pickett, B. E., Sadat, E. L., Zhang, Y., Noronha, J. M., Squires, R. B., Hunt, V., & Scheuermann, R. H. (2013). ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D593–D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1117>
 62. Pitt, A. S., & Buchanan, S. K. (2021). A Biochemical and Structural Understanding of TOM Complex Interactions and Implications for Human Health and Disease. *Cells*, 10(5), 1164. <https://doi.org/10.3390/cells10051164>
 63. Puchkova, L. V., Kiseleva, I. V., Polishchuk, E. V., Broggini, M., & Ilyechova, E. Y. (2021). The Crossroads between Host Copper Metabolism and Influenza Infection. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(11), 5498. <https://doi.org/10.3390/ijms22115498>
 64. Puntajes de calidad escalados por Phred. (2023, 8 mayo). *Gatk*. <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035531872-Phred-scaled-quality-scores>.
 65. Reiling, J. H., & Hafen, E. (2004). The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. *Genes & Development*, 18(23), 2879-2892. <https://doi.org/10.1101/gad.322704>.
 66. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing

- and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
67. Robinson, P. N., Piro, R. M., & Jäger, M. (2017). Computational Exome and Genome Analysis. En *Chapman and Hall/CRC eBooks*. <https://doi.org/10.1201/9781315154770>
 68. Rodríguez, Y., Rojas, M., Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Ramírez-Santana, C., Monsalve, D. M., Gershwin, M. E., & Anaya, J. (2018). Guillain–Barré syndrome, transverse myelitis and infectious diseases. *Cellular And Molecular Immunology*, 15(6), 547-562. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.142>
 69. Rolfe, A. J., Bosco, D. B., Wang, J., Nowakowski, R. S., Fan, J., & Ren, Y. (2016). Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell & Bioscience*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0110-x>.
 70. Roosendaal, J., Westaway, E. G., Khromykh, A. A., & Mackenzie, J. M. (2006). Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of NS4A. *Journal of Virology*, 80(13), 4623–4632. <https://doi.org/10.1128/JVI.02130-05>
 71. Sakaguchi, S., Suzuki, Y., Emi, A., Wu, H., & Nakano, T. (2020). Identification of cellular inhibitors against Chikungunya virus replication by a cDNA expression cloning combined with MinION sequencing. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 530(4), 617-623. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.036>
 72. Sekine, S., Wang, C., Sideris, D. P., Bunker, E., Zhang, Z., & Youle, R. J. (2019). Reciprocal Roles of Tom7 and OMA1 during Mitochondrial Import and Activation of PINK1. *Molecular Cell*, 73(5), 1028-1043.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.002>
 73. Servicio de Bioinformática. (2024). *Análisis de RNA-Seq*. <https://bioinfo.usal.es/RNASeq>
 74. Shi, H., Li, W., & Xu, X. (2016). Learning the Comparing and Converting Method of Sequence Phred Quality Score. *ATLANTIS PRESS*, 1951-6851. <https://doi.org/10.2991/meici-16.2016.55>.

75. Shore, D., & Albert, B. (2022). Ribosome biogenesis and the cellular energy economy. *Current Biology*, 32(12), R611-R617. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.083>.
76. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. (s. f.). *ViralZone*. ExPASy. Recuperado el 20 de junio de 2025, de <https://viralzone.expasy.org/>
77. Singh, D. B., & Pathak, R. K. (2021). *Bioinformatics: Methods and Applications*. Academic Press. <https://shop.elsevier.com/books/bioinformatics/singh/978-0-323-89775-4>
78. *Síntomas y Complicaciones del Zika*. (2024, 14 mayo). CDC. <https://www.cdc.gov/zika/es/signs-symptoms/sintomas-y-complicaciones-del-zika.html>
79. Staller, E., Carrique, L., Swann, O. C., Fan, H., Keown, J. R., Sheppard, C. M., Barclay, W. S., Grimes, J. M., & Fodor, E. (2024). Structures of H5N1 influenza polymerase with ANP32B reveal mechanisms of genome replication and host adaptation. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48470-3>
80. Su, S., Law, C. W., Ah-Cann, C., Asselin-Labat, M. L., Blewitt, M. E., & Ritchie, M. E. (2017). Glimma: interactive graphics for gene expression analysis. *Bioinformatics*, 33(13), 2050-2052. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx094>.
81. Sun, H., Sun, L., He, J., Shen, B., Yu, J., Chen, C., Yang, M., Sun, Y., Zhang, D., Ma, L., & Zhu, C. (2011). Cloning and characterization of ribosomal protein S29, a deltamethrin resistance associated gene from *Culex pipiens pallens*. *Parasitology Research*, 109(6), 1689-1697. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2443-z>
82. Sun, X., Hua, S., Chen, H., Ouyang, Z., Einkauf, K., Tse, S., Ard, K., Ciaranello, A., Yawetz, S., Sax, P., Rosenberg, E. S., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2017). Transcriptional Changes during Naturally Acquired Zika Virus Infection Render Dendritic Cells Highly Conducive to Viral Replication. *Cell Reports*, 21(12), 3471-3482. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.087>.
83. Tiwari, S. K., Dang, J., Qin, Y., Lichinchi, G., Bansal, V., & Rana, T. M. (2017). Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow

- sustained infection. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.9>.
84. Tong, L., Yang, C., Wu, P. Y., & Wang, M. D. (2016). Evaluating the impact of sequencing error correction for RNA-seq data with ERCC RNA spike-in controls. ... *IEEE-EMBS International Conference on Biomedical and Health Informatics*, 2016, 74–77. <https://doi.org/10.1109/BHI.2016.7455838>.
 85. Vázquez-Calvo, Á., et al. (2017). NS4A and NS4B proteins of flaviviruses induce autophagy and impair neurogenesis in human neural progenitor cells. *Autophagy*, 13(3), 593–605. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1264562>
 86. Vector Premium. (2020). *Estructura del virión del ZIKV* [Ilustración]. Freepik. https://www.freepik.com/free-vector/structure-particle-genome-virion-zika-virus-infographic-template_7529802.htm
 87. Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer. <https://ggplot2.tidyverse.org>
 88. World Health Organization: WHO. (2022, 8 diciembre). *Virus de Zika*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>.
 89. Xu, R., & Kuan, P. F. (2020). Negative binomial additive model for RNA-Seq data analysis. *BMC Bioinformatics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-020-3506-x>.
 90. Zimler, R. A., & Alto, B. W. (2021). The Extrinsic Incubation Period of Zika Virus in Florida Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Pathogens*, 10(10), 1252. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101252>
 91. Zhang, Y., Zhang, J., Chen, Y., & Jin, J. (2020). Viral proteins modulating host immune responses and apoptosis: mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, 11, 1211. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01211>
 92. Zhou, J., Yang, R., Zhang, Z., Liu, Q., Zhang, Y., Wang, Q., & Yuan, H. (2019). Mitochondrial protein PINK1 positively regulates RLR signaling. *Frontiers in Immunology*, 10, 1069. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01069>

ANEXOS

ANEXO I. Números de acceso de las secuencias de ZIKV de diferentes países del continente americano en los años 2015 y 2016 en humano y mosquito de las bases de datos ViPR (Virus Pathogen Resource) y en BV-BRC (Bacterialand Viral Bioinformatics).

Número de acceso	País	Fecha	Especie
KY559001	Brasil	2015	Homo sapiens
KY559003	Brasil	2015	Homo sapiens
MK216745	Brasil	2015	Homo sapiens
MW123925	Brasil	2015	Homo sapiens
MK028861	Panamá	2015	Homo sapiens
KX520666	Brasil	2015	Homo sapiens
KU497555	Brasil	2015	Homo sapiens
KY631493	México	2015	Homo sapiens
KY631494	México	2015	Homo sapiens
KX694534	Honduras	2015	Homo sapiens
KU501217	Guatemala	2015	Homo sapiens
KU501216	Guatemala	2015	Homo sapiens
KX548902	Colombia	2015	Homo sapiens
KU647676	Martinique	2015	Homo sapiens
MF574561	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574555	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574560	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574568	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574575	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574567	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574576	Colombia	2015	Homo sapiens

MF574559	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574572	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574562	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574556	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574558	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574566	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574565	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574571	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574573	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574563	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574569	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574564	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574570	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574557	Colombia	2015	Homo sapiens
KU820897	Colombia	2015	Homo sapiens
KX087102	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574553	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574552	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574574	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574577	Colombia	2015	Homo sapiens
MF574554	Colombia	2015	Homo sapiens
KY989971	Colombia	2015	Homo sapiens
MK028859	Panamá	2015	Homo sapiens
MN124091	Panamá	2015	Homo sapiens
MN100039	Panamá	2015	Homo sapiens
MN124090	Panamá	2015	Homo sapiens
KX156775	Panamá	2015	Homo sapiens
MK028858	Panamá	2015	Homo sapiens
KX156776	Panamá	2015	Homo sapiens
KX156774	Panamá	2015	Homo sapiens

MH513600	Brasil	2015	Homo sapiens
OL450364	Haití	2015	Homo sapiens
OL450366	Haití	2015	Homo sapiens
OL450365	Haití	2015	Homo sapiens
KU527068	Brasil	2015	Homo sapiens
NC_035889	Brasil	2015	Homo sapiens
KU729218	Brasil	2015	Homo sapiens
KX197205	Brasil	2015	Homo sapiens
KU321639	Brasil	2015	Homo sapiens
KX197192	Brasil	2015	Homo sapiens
KR872956	Brasil	2015	Homo sapiens
MF352141	Brasil	2015	Homo sapiens
KU729217	Brasil	2015	Homo sapiens
MF073359	Brasil	2015	Homo sapiens
MF073358	Brasil	2015	Homo sapiens
KU312312	Surinam	2015	Homo sapiens
MK028857	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
MH158237	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
KX377337	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
KU501215	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
VR-1843	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
MK713748	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
KX087101	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
KX601168	Puerto Rico	2015	Homo sapiens
KU365778	Brasil	2015	Homo sapiens
KU758877	Guayana Francesa	2015	Homo sapiens
KU365779	Brasil	2015	Homo sapiens
KU707826	Brasil	2015	Homo sapiens
KU365777	Brasil	2015	Homo sapiens
KU365780	Brasil	2015	Homo sapiens

MH513598	Brasil	2015	Homo sapiens
MW123926	Brasil	2015	Homo sapiens
KX280026	Brasil	2015	Homo sapiens
MH513599	Brasil	2015	Homo sapiens
KY120349.2	México	2016	Homo sapiens
MT439645	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439646	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439647	Brasil	2016	Homo sapiens
MT483911	Brasil	2016	Homo sapiens
MF794971	Ecuador	2016	Homo sapiens
MF801377	El Salvador	2016	Homo sapiens
MF801378	Guatemala	2016	Homo sapiens
MF801379	Guatemala	2016	Homo sapiens
MF801380	Guatemala	2016	Homo sapiens
MF801381	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801382	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801383	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801384	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801385	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801386	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801387	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801388	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801389	Honduras	2016	Homo sapiens
MF801390	México	2016	Homo sapiens
MF801391	México	2016	Homo sapiens
MF801392	México	2016	Homo sapiens
MF801393	México	2016	Homo sapiens
MF801394	México	2016	Homo sapiens
MF801395	México	2016	Homo sapiens
MF801396	México	2016	Homo sapiens

MF801397	México	2016	Homo sapiens
MF801398	México	2016	Homo sapiens
MF801399	México	2016	Homo sapiens
MF801400	México	2016	Homo sapiens
MF801401	México	2016	Homo sapiens
MF801402	México	2016	Homo sapiens
MF801403	México	2016	Homo sapiens
MF801404	México	2016	Homo sapiens
MF801405	México	2016	Homo sapiens
MF801406	México	2016	Homo sapiens
MF801407	México	2016	Homo sapiens
MF801408	México	2016	Homo sapiens
MF801409	México	2016	Homo sapiens
MF801410	México	2016	Homo sapiens
MF801411	México	2016	Homo sapiens
MF801412	México	2016	Homo sapiens
MF801413	México	2016	Homo sapiens
MF801414	México	2016	Homo sapiens
MF801415	México	2016	Homo sapiens
MF801416	México	2016	Homo sapiens
MF801417	México	2016	Homo sapiens
MF801418	México	2016	Homo sapiens
MF801419	México	2016	Homo sapiens
MF801420	México	2016	Homo sapiens
MF801421	México	2016	Homo sapiens
MF801422	México	2016	Homo sapiens
MF801423	México	2016	Homo sapiens
MF801424	México	2016	Homo sapiens
MF801425	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF801426	Nicaragua	2016	Homo sapiens

MT636065	Argentina	2016	Homo sapiens
MH675619	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675620	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675621	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675622	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675623	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675624	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675625	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675626	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675627	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675628	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675629	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH675630	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK049245	Colombia	2016	Homo sapiens
MK049246	Colombia	2016	Homo sapiens
MK049248	Colombia	2016	Homo sapiens
MK049249	Colombia	2016	Homo sapiens
MK049250	Colombia	2016	Homo sapiens
MK049251	Colombia	2016	Homo sapiens
MK049252	Colombia	2016	Homo sapiens
KY631492	Brasil	2016	Homo sapiens
KU758868	Guayana Francesa	2016	Homo sapiens
KU758869	Guayana Francesa	2016	Homo sapiens
KX173840	Brasil	2016	Homo sapiens
KX173841	Brasil	2016	Homo sapiens
KX173842	Brasil	2016	Homo sapiens
KX173843	Brasil	2016	Homo sapiens
KX173844	Brasil	2016	Homo sapiens
KU758872	Guayana Francesa	2016	Homo sapiens
KY693676	Honduras	2016	Homo sapiens

KY693677	Honduras	2016	Homo sapiens
KY693678	Perú	2016	Homo sapiens
KY693679	Perú	2016	Homo sapiens
KY693680	Venezuela	2016	Homo sapiens
KU758873	Guayana Francesa	2016	Homo sapiens
KX216637	Guayana	2016	Homo sapiens
KU758874	Guayana Francesa	2016	Homo sapiens
KY765317	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765318	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765319	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765320	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765321	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765322	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765323	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KU758875	Guayana Francesa	2016	Homo sapiens
KY765324	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765325	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MW008559	Trinidad y tobago	2016	Homo sapiens
KY765326	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KY765327	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MW012427	Trinidad y tobago	2016	Homo sapiens
MW012428	Trinidad y tobago	2016	Homo sapiens
KY785409	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785410	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785411	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785412	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY785413	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785414	Honduras	2016	Homo sapiens
KY785415	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785416	Honduras	2016	Homo sapiens

KY785417	Colombia	2016	Homo sapiens
KY785418	Honduras	2016	Homo sapiens
KY785419	Jamaica	2016	Homo sapiens
KY785420	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785421	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY785423	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785424	Jamaica	2016	Homo sapiens
KY785425	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785426	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785427	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785428	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785429	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785430	Jamaica	2016	Homo sapiens
KY785431	Honduras	2016	Homo sapiens
KY785432	Jamaica	2016	Homo sapiens
KY785433	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785434	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785435	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785436	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785437	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216687	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216688	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785438	Jamaica	2016	Homo sapiens
MK216689	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785439	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216690	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785440	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK216691	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785441	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216692	Brasil	2016	Homo sapiens

KY785442	Honduras	2016	Homo sapiens
MK216693	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785443	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK216694	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785444	Honduras	2016	Homo sapiens
MK216695	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785445	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK216696	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785446	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785447	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216697	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216698	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785448	Honduras	2016	Homo sapiens
KY785449	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216699	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785450	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785451	Martinique	2016	Homo sapiens
MK216702	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785452	Honduras	2016	Homo sapiens
KY785453	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216703	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216704	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216705	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785455	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785456	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216706	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785457	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK216707	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785458	Honduras	2016	Homo sapiens
MK216708	Brasil	2016	Homo sapiens

KY785459	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK216709	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785460	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216710	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785461	Honduras	2016	Homo sapiens
MK216711	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785462	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MK216712	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785463	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216713	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785464	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KY785465	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216714	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785466	Colombia	2016	Homo sapiens
MK216715	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785467	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216716	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216717	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785469	Colombia	2016	Homo sapiens
MK216718	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785470	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216719	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785471	Honduras	2016	Homo sapiens
MK216720	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216721	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785473	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216722	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216723	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785474	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY785475	República Dominicana	2016	Homo sapiens

MK216724	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785476	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216725	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216726	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785477	Colombia	2016	Homo sapiens
MK216727	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785478	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216728	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785479	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785480	Brasil	2016	Homo sapiens
MK216730	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785481	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MK216731	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785482	Haití	2016	Homo sapiens
MK216732	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785483	República Dominicana	2016	Homo sapiens
MK216733	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785484	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY785485	Brasil	2016	Homo sapiens
KX247646	Colombia	2016	Homo sapiens
KU870645	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK216746	Brasil	2016	Homo sapiens
MG877675	Colombia	2016	Homo sapiens
KX261851	Colombia	2016	Homo sapiens
KX261852	Colombia	2016	Homo sapiens
KX261853	Colombia	2016	Homo sapiens
KX261854	Colombia	2016	Homo sapiens
KX261855	Colombia	2016	Homo sapiens
KX262887	Honduras	2016	Homo sapiens
KY817930	Brasil	2016	Homo sapiens

MW122373	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122374	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122375	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122376	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122377	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122378	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122379	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122380	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122381	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122382	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122383	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122384	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122385	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122386	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122387	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122388	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122389	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122390	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122391	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122392	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122393	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122394	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122395	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122396	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122397	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122398	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122399	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122400	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122401	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122402	Puerto Rico	2016	Homo sapiens

MW122403	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122404	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122405	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122406	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122407	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122408	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122409	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122410	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122411	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122412	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122413	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122414	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122417	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122418	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122419	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122420	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122421	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122422	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122423	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122424	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122425	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122426	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122427	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122428	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122429	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122430	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122431	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KX358623	Venezuela	2016	Homo sapiens
MH882527	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882528	Brasil	2016	Homo sapiens

MH882530	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882531	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882532	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882533	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882534	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882535	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882536	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882529	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882537	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882538	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882539	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882540	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882541	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882542	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882543	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882544	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882545	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882546	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882547	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882548	Brasil	2016	Homo sapiens
MH882549	Brasil	2016	Homo sapiens
KX380262	México	2016	Homo sapiens
KX421194	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KX421195	Nicaragua	2016	Homo sapiens
KX443144	Brasil	2016	Homo sapiens
KX443145	Brasil	2016	Homo sapiens
MK269353	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK269354	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK269355	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK269356	Estados Unidos	2016	Homo sapiens

MK269357	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK269358	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK269359	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK269360	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MK269361	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY968096	Brasil	2016	Homo sapiens
KY968097	Brasil	2016	Homo sapiens
KY968098	Brasil	2016	Homo sapiens
MW122432	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KX702400	Venezuela	2016	Homo sapiens
KX766028	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KX766029	México	2016	Homo sapiens
KX827268	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX830930	Brasil	2016	Homo sapiens
KX832731	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX842449	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX879603	Ecuador	2016	Homo sapiens
KX879604	Ecuador	2016	Homo sapiens
KX893855	Venezuela	2016	Homo sapiens
KX906952	Honduras	2016	Homo sapiens
KX922703	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX922704	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX922705	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX922706	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX922707	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KX928077	Honduras	2016	Homo sapiens
MW122433	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KX954122	México	2016	Homo sapiens
KY014295	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY014296	Brasil	2016	Homo sapiens

KY014297	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014298	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY014300	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014301	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014302	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014303	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014304	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014305	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014306	Honduras	2016	Homo sapiens
KY014307	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014308	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014309	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014310	Honduras	2016	Homo sapiens
KY014311	Honduras	2016	Homo sapiens
KY014312	Honduras	2016	Homo sapiens
KY014313	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014314	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014315	Honduras	2016	Homo sapiens
KY014316	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY014317	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014318	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014319	Honduras	2016	Homo sapiens
KY014320	Brasil	2016	Homo sapiens
KY014321	República Dominicana	2016	Homo sapiens
KY014325	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY014326	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY014327	Honduras	2016	Homo sapiens
KY042039	Brasil	2016	Homo sapiens
MW122434	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KY042043	Guatemala	2016	Homo sapiens

KY042044	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH157195	México	2016	Homo sapiens
MH157196	México	2016	Homo sapiens
MH157197	México	2016	Homo sapiens
MH157198	México	2016	Homo sapiens
MH157199	México	2016	Homo sapiens
MH157200	México	2016	Homo sapiens
MH157201	México	2016	Homo sapiens
MH157202	México	2016	Homo sapiens
MH157203	México	2016	Homo sapiens
MH157204	México	2016	Homo sapiens
MN473450	Canadá	2016	Homo sapiens
MH157205	México	2016	Homo sapiens
MN473451	Canadá	2016	Homo sapiens
MN473452	Canadá	2016	Homo sapiens
MH157206	México	2016	Homo sapiens
MH157207	México	2016	Homo sapiens
MN473453	Canadá	2016	Homo sapiens
MH157208	México	2016	Homo sapiens
MN473454	Canadá	2016	Homo sapiens
MH157209	México	2016	Homo sapiens
MH157210	México	2016	Homo sapiens
MH157211	México	2016	Homo sapiens
MH157212	México	2016	Homo sapiens
MH157213	México	2016	Homo sapiens
MH157214	México	2016	Homo sapiens
MW122416	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122436	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
OK054369	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054370	Nicaragua	2016	Homo sapiens

OK054372	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054373	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054371	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054376	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054375	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054374	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054377	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054378	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054379	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054382	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054380	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054381	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054384	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054383	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054386	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054385	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054388	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054387	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054389	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MW122435	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
OK054390	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054391	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054394	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054392	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054393	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054396	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054395	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054397	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054398	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054400	Nicaragua	2016	Homo sapiens

OK054399	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054401	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054403	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054404	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054402	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054407	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054405	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054406	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054408	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054409	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054410	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054411	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054412	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054413	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054415	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054414	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054416	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054419	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054417	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054418	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054422	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054420	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054421	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054426	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054424	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054423	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054425	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054427	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054428	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054429	Nicaragua	2016	Homo sapiens

OK054430	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054432	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054431	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054433	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054435	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054434	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054436	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054437	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054439	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054438	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054443	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054441	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054440	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054442	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054444	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054445	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054447	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054446	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054450	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054451	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054448	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054449	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054452	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054453	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054454	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054457	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054455	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054456	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054458	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054460	Nicaragua	2016	Homo sapiens

OK054459	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054461	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054463	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054462	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054465	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054464	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054466	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054468	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054467	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054469	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054470	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054471	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054472	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054473	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054474	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054475	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054478	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054477	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054476	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054479	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054481	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054480	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054484	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054482	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054483	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054485	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054486	Nicaragua	2016	Homo sapiens
OK054487	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MW122437	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW123921	Brasil	2016	Homo sapiens

MW123922	Brasil	2016	Homo sapiens
MW123923	Brasil	2016	Homo sapiens
MW123924	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423647	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423648	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423649	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423650	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423651	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423652	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423653	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423654	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423655	Brasil	2016	Homo sapiens
OL423669	Brasil	2016	Homo sapiens
ON586853	México	2016	Homo sapiens
MW122438	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122439	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122440	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122441	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KU922923	México	2016	Homo sapiens
KU922960	México	2016	Homo sapiens
KU926309	Brasil	2016	Homo sapiens
KU926310	Brasil	2016	Homo sapiens
MW122442	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KU937936	Surinam	2016	Homo sapiens
KU954085	Colombia	2016	Homo sapiens
MW122443	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MG494697	México	2016	Homo sapiens
MW122444	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122445	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KX051563	Haiti	2016	Homo sapiens

MW122446	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KX101065	Brasil	2016	Homo sapiens
MW122447	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122448	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MW122449	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KY075932	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY075933	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY075934	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY075935	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY075936	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
MW122453	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KY120349	México	2016	Homo sapiens
MW122454	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MN577550	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF048802	Brasil	2016	Homo sapiens
MF048803	Brasil	2016	Homo sapiens
MF048804	Brasil	2016	Homo sapiens
MF048805	Brasil	2016	Homo sapiens
MF048806	Brasil	2016	Homo sapiens
MF048807	Brasil	2016	Homo sapiens
MF048808	Brasil	2016	Homo sapiens
MF073357	Brasil	2016	Homo sapiens
MF077458	Brasil	2016	Homo sapiens
MF077459	Brasil	2016	Homo sapiens
MF077460	Brasil	2016	Homo sapiens
MF077461	Brasil	2016	Homo sapiens
MF077462	Brasil	2016	Homo sapiens
MF077463	Brasil	2016	Homo sapiens
MH249062	Brasil	2016	Homo sapiens
MH249063	Brasil	2016	Homo sapiens

MH249064	Brasil	2016	Homo sapiens
MH249065	Brasil	2016	Homo sapiens
MH249066	Brasil	2016	Homo sapiens
MH249067	Brasil	2016	Homo sapiens
KY272991	Brasil	2016	Homo sapiens
MH306203	Brasil	2016	Homo sapiens
KY317936	Colombia	2016	Homo sapiens
KY317937	Colombia	2016	Homo sapiens
KY317938	Colombia	2016	Homo sapiens
KY317939	Colombia	2016	Homo sapiens
KY317940	Colombia	2016	Homo sapiens
KY325464	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325465	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325466	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325467	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325468	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325470	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325469	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325471	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325472	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325473	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325474	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325475	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325476	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325477	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325478	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325479	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325480	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325481	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY325482	Estados Unidos	2016	Homo sapiens

KY325483	Estados Unidos	2016	Homo sapiens
KY328289	Honduras	2016	Homo sapiens
KY348640	Surinam	2016	Homo sapiens
MH379777	Brasil	2016	Homo sapiens
MH379778	Brasil	2016	Homo sapiens
MH379779	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH379780	Brasil	2016	Homo sapiens
MH379781	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH379782	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
MH379783	Brasil	2016	Homo sapiens
MH379784	Puerto Rico	2016	Homo sapiens
KY441401	Brasil	2016	Homo sapiens
KY441402	Brasil	2016	Homo sapiens
KY441403	Brasil	2016	Homo sapiens
MG012228	Colombia	2016	Homo sapiens
MG012229	Colombia	2016	Homo sapiens
MG012230	Colombia	2016	Homo sapiens
LR792671	Colombia	2016	Homo sapiens
KY558990	Brasil	2016	Homo sapiens
KY558991	Brasil	2016	Homo sapiens
KY558992	Brasil	2016	Homo sapiens
KY558993	Brasil	2016	Homo sapiens
KY558994	Brasil	2016	Homo sapiens
KY558999	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559004	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559005	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559006	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559007	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559008	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559009	Brasil	2016	Homo sapiens

KY559010	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559011	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559012	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559013	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559014	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559015	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559016	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559017	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559018	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559019	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559020	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559021	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559022	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559023	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559024	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559025	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559026	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559027	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559028	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559029	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559030	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559031	Brasil	2016	Homo sapiens
KY559032	Brasil	2016	Homo sapiens
KY561343	Brasil	2016	Homo sapiens
KY561344	Brasil	2016	Homo sapiens
KY561345	Brasil	2016	Homo sapiens
MK713750	Honduras	2016	Homo sapiens
KY606271	México	2016	Homo sapiens
KY606272	México	2016	Homo sapiens
KY606273	México	2016	Homo sapiens

KY606274	México	2016	Homo sapiens
MF434516	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF434517	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF434518	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF434519	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF434520	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF434521	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF434522	Nicaragua	2016	Homo sapiens
MF574578	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574579	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574580	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574581	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574582	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574583	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574584	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574585	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574586	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574587	Colombia	2016	Homo sapiens
MF574588	Colombia	2016	Homo sapiens
MT439638	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439639	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439640	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439641	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439642	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439643	Brasil	2016	Homo sapiens
MT439644	Brasil	2016	Homo sapiens
KY785472	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY785422	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY014299	Estados Unidos	2016	Mosquito
KX922708	Estados Unidos	2016	Mosquito

KY075937	Estados Unidos	2016	Mosquito
MF988743	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY014322	Estados Unidos	2016	Mosquito
KX838906	Estados Unidos	2016	Mosquito
MN185326	Guayana Francesa	2016	Mosquito
KX838904	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY014324	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY785468	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY075938	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY075939	Estados Unidos	2016	Mosquito
KY014323	Estados Unidos	2016	Mosquito
KX838905	Estados Unidos	2016	Mosquito
MN185331	Guadalupe	2016	Mosquito
MN185328	Guayana Francesa	2016	Mosquito
MN185327	Guadalupe	2016	Mosquito
MF384325	Haití	2016	Mosquito
MF783072	Haití	2016	Mosquito
MN185324	Guadalupe	2016	Mosquito
MN185330	Guadalupe	2016	Mosquito
MN185332	Guadalupe	2016	Mosquito
MN185329	Guadalupe	2016	Mosquito
ON586852	Guadalupe	2016	Mosquito
ON586854	Guadalupe	2016	Mosquito
KY648934	México	2016	Mosquito
KX856011	México	2016	Mosquito
MH900227	México	2016	Mosquito
KX446950	México	2016	Mosquito
KX446951.2	México	2016	Mosquito
KX446951	México	2016	Mosquito
MF783073	Haiti	2016	Mosquito

MN185325	Guadalupe	2016	Mosquito
MK049247	Colombia	2016	Mosquito

ANEXO II. Script de python para generar una tabla .tsv con los archivos .txt generados por featureCounts.

```
import string
import sys
import os

# python3 mergeedgeR.py output.tsv
counts={}
os.popen('ls *.txt > lista')
archivos =[]
infh1 = open('lista')
line = infh1.readline()
while line:archivos.append(line.replace('\n', '')) line =
infh1.readline()
infh1.close()

def read_input(infh, counts):
    line= infh.readline()
    line= infh.readline()
    line= infh.readline()
    while line:
        a = line.split('\t')
        suma=int(a[6])+int(a[7])+int(a[8])+int(a[9])
        if a[0] not in counts.keys():
            counts[a[0]] =[suma]
        else:
            counts[a[0]].append(suma)
```

```

        line = infh.readline()
    print('Done')
    return counts

for elem in archivos:
    infh =(open(elem))
    counts = read_input(infh, counts)

out = 'GeneID'
for a in archivos:
    out += '\t'+ a
out+= '\n'

for gene in counts.keys():
    out += gene
    for elem in counts[gene]:
        out += '\t' + elem
    out += '\n'

outfh = open(sys.argv[1], 'w')
outfh.write(out)
outfh.close()

```

ANEXO III. Script para el análisis de expresión diferencial en R.

```

library(edgeR)
library(limma)
library(Glimma)

x <- read.delim("ComparacionTodos.tsv", row.names="GeneID")
group <- factor(c(2,1,1,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8))
y <- DGEList(counts=x, group=group)

```

```

keep <- filterByExpr(y)
y <- y[keep,,keep.lib.sizes=FALSE]
y <- calcNormFactors(y)
design <- model.matrix(~group)
y <- estimateDisp(y,design)

m31NS124H<-cbind(x[,c(1, 4,5)])
group<-factor(c(2,2,1))
y31NS124H <- DGEList(counts=m31NS124H,group=group)
y31NS124H <- y31NS124H[keep,,keep.lib.sizes=FALSE]
y31NS124H <- calcNormFactors(y31NS124H)
group <- factor(c(rep("treat",2),rep("ctrl",1)))
list <- DGEList(counts=y31NS124H,group=group)

#Gráfica library size
jpeg("31NS124H1.jpg")
barplot(list$samples$lib.size*1e-6,names=1:3,ylab="Library size
(millions)")
dev.off()

#Gráfico de dispersión multidimensional (MDS).
jpeg("31NS124H2.jpg")
plotMDS(list, col=rep(1:3, each=3))
dev.off()

#Mapa de Calor (Heatmap)
jpeg("31NS124H3.jpg")
logcpm <- cpm(list, log=TRUE)
heatmap(logcpm)
dev.off()

```

```

list <- estimateDisp(list)
list$common.dispersion

tested <- exactTest(list, pair=c("ctrl", "treat"))

topTags(tested)
resultsTbl <- topTags(tested, n=nrow(tested$table))$table
write.table(resultsTbl, file="stats_exactTest.csv", sep=",",
row.names=TRUE)
o <- order(tested$table$PValue)
cpm(list)[o[1:10],]
summary(decideTests(tested))

#Gráfica tipo MD Plot
jpeg("31NS124H10.jpg")
plotMD(tested)
abline(h=c(-1, 1), col="blue")
dev.off()

#Gráfica tipo MD Plot más detallada
rnaseq$samples$group
design <- model.matrix(~0+group)
contrasts <- cbind(Smchd1null.vs.WT=c(-1,1))
vm <- voomWithQualityWeights(yOXA24HS1, design=design)
fit <- lmFit(vm, design=design)
fit <- contrasts.fit(fit, contrasts)
fit <- eBayes(fit)
dt <- decideTests(fit)
summary(dt)
glMDPlot(fit, status=dt, counts=vm, group=group,
side.main="Symbols", folder="PR24HS1")

```

ANEXO IV. Código para generar diagrama de Venn en R.

```
library(VennDiagram)
venn.plot <- draw.pairwise.venn( area1 = 117, (104 + 13) area2
= 16, cross.area = 13, category = c("OAX", "31N"), fill =
c("skyblue", "salmon"), lty = "blank", cex = 1, cat.cex = 1,
cat.pos = c(-20, 20), cat.dist = 0.05)
grid::grid.newpage()
grid::grid.draw(venn.plot)
```

ANEXO V. Script para realizar gráficas de barras en R.

```
library(ggplot2)
pb<- read.table(file ='Procesosbiologicos.tsv', header=T, sep ='t')
ggplot(pb, aes(x=as.factor(Category), y =Percent, fill = Category) ) +
geom_bar(stat = "identity")
```

ANEXO VI. Script funcional para realizar prueba estadística T de Wetch en Python (24 h y 48 h)..

```
import pandas as pd
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns

sns.set_style("whitegrid")
file_name = "estadisticos.xlsx - Hoja1.csv"
BONFERRONI_THRESHOLD = 0.0167
df = pd.read_csv(file_name)
df_clean = df.dropna(subset=['Cepa']).copy()
```

```

df_clean = df_clean.rename(columns={
    'Media muestral': 'Media_muestral',
    'Valor de p (dos colas)': 'P_value_texto_original',})

if df_clean['2(-ΔΔct) R4'].dtype == 'object':
    df_clean['2(-ΔΔct) R4'] = df_clean['2(-ΔΔct)
R4'].str.replace(',', ' ', regex=False)

df_clean['Media_muestral'] =
pd.to_numeric(df_clean['Media_muestral'], errors='coerce')

df_clean['P_value_Original'] =
df_clean['P_value_texto_original'].str.replace('p=', ' ',
regex=False).astype(float, errors='ignore')
split_cepa = df_clean['Cepa'].str.split(' ', n=1, expand=True)
df_clean['Cepa_Estandar'] = split_cepa[0]
df_clean['Tiempo'] = split_cepa[1]

def get_significance_symbol_bonferroni(p_value):
    if pd.isna(p_value):
        return 'ns'
    if p_value < 0.001:
        return '***'
    elif p_value < 0.01:
        return '**'
    elif p_value < BONFERRONI_THRESHOLD:
        return '*'
    else:
        return 'ns'

```

```

df_clean['Significancia_Final'] =
df_clean['P_value_Original'].apply(get_significance_symbol_bonf
erroni)
df_24h_plot = df_clean[df_clean['Tiempo'] == '24 h'].copy()
df_48h_plot = df_clean[df_clean['Tiempo'] == '48 h'].copy()

def plot_relative_expression_final(df_plot, time_point,
filename):
    plt.figure(figsize=(8, 6))
    bars = sns.barplot(x='Cepa', y='Media_muestral', data=df_plot,
palette="viridis", errorbar=None)
    for i, bar in enumerate(bars.patches):
        cepa_estandar = df_plot.iloc[i]['Cepa_Estandar']
        significancia = df_plot.iloc[i]['Significancia_Final']
        if cepa_estandar == 'Mock': continue
        y_max = df_plot.iloc[i]['Media_muestral']
        annotation_y = y_max + 0.1

        if y_max < 0.5: annotation_y = 0.5
        plt.text(bar.get_x() + bar.get_width() / 2,
annotation_y, significancia, ha='center', va='bottom',
fontsize=12, color='black')

        plt.title(f'Expresión Relativa  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$  -
{time_point} (Corr. Bonferroni)')
        plt.xlabel('Cepa/Condición')
        plt.ylabel(r'Expresión Relativa  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ ',
fontsize=12)
        plt.xticks(rotation=45, ha='right')
        y_limit = df_plot['Media_muestral'].max() * 1.2
        if y_limit < 1.5:
            y_limit = 1.5
        plt.ylim(0, y_limit)

```

```

plt.tight_layout()
plt.savefig(filename, dpi=300)
plt.close()
plot_relative_expression_final(df_24h_plot,      '24      Horas',
'expresion_relativa_24h_final_bonferroni.png')
plot_relative_expression_final(df_48h_plot,      '48      Horas',
'expresion_relativa_48h_final_bonferroni.png')

print("Graficasfinal.")

```

ANEXO VII. GED al comparar las células no infectadas contra las infectadas con la cepa OAX a las 24 h post infección.

Symbols	FC	Description
LOC5567217	0.00027733	Glutactin
LOC5573102	0.00047534	Miembro 7 de la subfamilia MAGUK p55
LOC5566223	0.03365116	No caracterizado
LOC5564053	0.45446454	Proteína stunted
LOC5569670	0.46913734	Proteína ribosomal S29 de la subunidad 40S
LOC5567587	0.49488011	No caracterizado
LOC5573012	0.56963937	Nexina clasificación 16
LOC5572304	0.57900768	Proteína homeótica distal-less
LOC110674732	0.590004	No caracterizado

LOC5570429	0.60283714	Proteína disulfuro-isomerasa A5
LOC5571735	0.61376201	Subunidad 6C-2 de la citocromo c oxidasa
LOC5565553	0.61390335	No caracterizado
LOC5564798	0.62965115	Subunidad de la ATP sintasa mitocondrial
LOC5567581	0.63620928	Subunidad beta tipo 3 del proteasoma
LOC5575681	0.65856705	No caracterizado
LOC5569124	0.66038926	Subunidad de ferritina
LOC5576170	0.66130225	Nucleósido difosfato quinasa
LOC5573879	0.66175922	Subunidad 6 del complejo citocromo b-c1, mitocondrial
LOC5576658	0.6678824	Probable ribosome biogenesis protein RLP24
LOC5575828	0.68849375	Subunidad 4 del regulador del proteasoma 26S
LOC5579111	0.70599236	Factor de inicio de la traducción eucariota 5A
LOC110677182	0.7066429	Proteína ribosomal 40S similar a S21
LOC5564931	0.72027775	Proteína ribosomal S21 de la subunidad 40S
LOC5577996	0.72577165	Proteína ribosomal L32 de la subunidad 60S

LOC5563646	0.72644042	Proteína ribosomal S25 de la subunidad 40S
LOC5564226	0.73046599	Proteína ribosomal S17 de la subunidad 40S
LOC5573851	0.73824413	Tiorredoxina-2
LOC5578123	0.73926475	Proteína ribosomal S16 de la subunidad 40S
LOC5571500	0.73960528	Subunidad 3 del complejo activador del proteasoma
LOC5578368	0.74336139	Proteína ribosomal P1 ácida de la subunidad 60S
LOC5566522	0.74765286	Proteína ribosomal 60S L38
LOC5567070	0.75352905	Proteína ribosomal L26 de la subunidad 60S
LOC5571927	0.75352905	Proteína ribosomal 60S L39
LOC110677764	0.76365992	Proteína ribosomal de la subunidad 60S similar a L13a
LOC5569582	0.76471569	Proteína ribosomal L22 de la subunidad 60S
LOC5573217	0.76877632	Proteína ribosomal 40S S12
LOC5563952	0.7730365	Carboxilesterasa 1F
LOC5575105	0.77947107	Proteína ribosomal 40S S15

LOC110675493	0.79049659	Proteína ribosomal L28 de la subunidad 60S
LOC110676045	0.79473072	Proteína ribosomal S27 de la subunidad 40S
LOC5565624	0.80922632	Proteína ribosomal S24 de la subunidad 40S
LOC5569531	0.8093754	Proteína ribosomal L21 de la subunidad 60S
LOC5568090	0.8131862	Proteína ribosomal L40 ubiquitina-60S
LOC5565962	0.82296241	Proteína ribosomal 60S L30
LOC5572365	0.83320142	Proteína ribosomal S18 de la subunidad 40S
LOC5577034	0.83685459	Proteína ribosomal L11 de la subunidad 60S
LOC5574526	1.1628401	Actina-5C
LOC110678000	1.22408182	Subunidad p21 de la proteína ribonucleasa P
LOC5565589	1.24276782	ciclina G
LOC5575790	1.28617481	Subunidad alfa de la ATPasa transportadora de sodio/potasio
LOC5575011	1.29628352	Citidililtransferasa de colina-fosfato B
LOC5576166	1.29890867	Chaperona de cobre para la superóxido dismutasa

LOC5568714	1.33444291	Proteína de unión al elemento 1 río arriba
LOC5577566	1.33690331	Proteína ribosomal L37a de la subunidad 6
LOC5573418	1.3415288	Helicasa RNA dependiente de ATP dbp2
LOC23687839	1.34648029	Proteína dedo de zinc tipo CCHC CG3800
LOC5564231	1.36458314	Proteína asociada a microtúbulos RP/EB
LOC5573211	1.36867395	Proteína de unión a poliadenilato
LOC5567031	1.37784384	Aldolasa fructosa-bisfosfato
LOC110676861	1.38070215	Cadena de colágeno alfa-1(IV)
LOC5565409	1.39862086	Innexin inx2
LOC5564925	1.40442968	Sintasa de S-adenosilmetionina
LOC5569180	1.41123715	Proteína CREB de unión a elementos de respuesta a cAMP
LOC5576734	1.42462316	Proteína A tipo myb
LOC5575585	1.42790725	Proteína 10 que contiene dominios de desintegrina y metaloproteinasa
LOC5564259	1.42889396	No caracterizado
LOC5576319	1.4474381	Teneurin-m
LOC5571789	1.45646482	Proteína relacionada con ras Rab-11B
LOC5575986	1.4601585	Componente succinil transferasa de dihidrolipoilisina del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa, mitocondria

LOC5569700	1.4601585	Proteína relacionada con Ras Rab-5B
LOC5573007	1.49589118	Desmetilasa del DNA N6-metiladenina
LOC5579061	1.51984745	Subunidad beta de la proteína fijadora de nucleótidos de guanina
LOC5567559	1.53285121	Histona H3.3
LOC5576263	1.53567743	Proteína materna pumilio
LOC5573444	1.57543322	Proteína pokkuri de unión al DNA
LOC5576630	1.5823407	Syntaxin-1A
LOC5573862	1.63832478	Subunidad beta-2 de la ATPasa transportadora de sodio/potasio
LOC5565400	1.65805908	Proteína similar a la antizima de la ornitina descarboxilasa
LOC5574731	1.67725849	No caracterizado
LOC5570958	1.6853884	Homólogo del activador quinasa dependiente de RNA bicatenario inducido por interferón
LOC5565301	1.69277798	Proteína BTG1
LOC5566385	1.70726132	Proteína dedo de zinc 420
LOC5579851	1.71198518	Receptor relacionado con sortilina
LOC5570318	1.72544055	Ribonucleoproteína 27C nuclear heterogénea

LOC5566678	1.76603782	Proteína 3 de la familia que contiene el dominio YTH
LOC5575938	1.76725818	akirin
LOC5564518	1.77133213	Proteína Júpiter asociada a microtúbulos
LOC5572753	1.7910182	Proteína E1 con dominio de choque frío
LOC5573065	1.83400282	Proteína dedo de zinc tipo AN1 6
LOC5569968	1.86723939	Proteína Scylla
LOC5576110	1.89845366	No caracterizado
LOC5570335	1.90151607	Homólogo del factor Y-box
LOC5571731	1.90370653	Adhesina rica en serina para plaquetas
LOC5571006	1.92043671	RNA helicasa dependiente de ATP DBP2
LOC5578713	1.95029362	Beta-1,3-galactosiltransferasa 5
LOC5577719	1.96969962	Profilin
LOC5572184	1.98792502	Receptor de ecdisona
LOC5574435	2.00631907	No caracterizado
LOC5579840	2.05305224	Subunidad 12 del mediador de la transcripción de la RNA polimerasa II
LOC5577812	2.19684795	No caracterizado
LOC5566136	2.30515429	Proteína similar a capon
LOC5573370	2.36374161	Subunidad B tipo 2 de calcineurina

LOC5566585	2.4043628	Subunidad reguladora de la ligasa de glutamato-cisteína
LOC5578717	2.47856322	Proteína dedo de zinc chinmo
LOC23687632	2.58107129	Miembro B de la familia de las proteínas nucleares 32 ricas en leucina ácida
LOC5570048	2.62784654	Proteína FAM57A
LOC5574376	2.84642667	Adhesina rica en serina para plaquetas
LOC5569188	2.87210293	Proteína Gawky
LOC5571120	2.91541242	Proteína muscleblind
LOC5570710	2.93021846	Proteína alfa quinasa 1
LOC5565922	2.97851643	Inhibidor NF-kappa-B cactus
LOC5569186	2.98263425	Proteína Gawky
LOC5571097	3.00746097	No caracterizado
LOC5569758	3.02343057	No caracterizado
LOC5563960	3.26888769	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4H
LOC5574380	4.55617084	No caracterizado
LOC5573836	4.99689243	Homólogo de titin

ANEXO VIII. GED al comparar las células infectadas con la cepa 31N contra las células infectadas con la cepa OAX a las 24 h post infección.

Symbols	FC	Description
LOC5572173	0.288469565	mitochondrial import receptor subunit TOMM7 homolog
LOC5569670	0.464836262	40S ribosomal protein S29
LOC5565553	0.526987119	No caracterizado
LOC5569124	0.564286941	ferritin subunit
LOC5571086	0.600343759	putative salivary secreted peptide
LOC5566522	0.639882157	60S ribosomal protein L38
LOC5576166	1.34779399	Chaperona de cobre para la superóxido dismutasa
LOC5577719	1.604722714	profilin
LOC5568583	1.612129778	putative inorganic phosphate cotransporter
LOC5572753	1.659969085	cold shock domain-containing protein E1 (CSDE1)
LOC23687632	1.631172909	miembro B de la familia de la fosfoproteína nuclear 32 rica en leucina ácida
LOC5563960	2.257355711	eukaryotic translation initiation factor 4H (eIF4H)
LOC5569968	2.498618781	protein scylla
LOC5573370	2.503802104	calcineurin subunit B type 2
LOC5571120	2.947134796	protein muscleblind

LOC5571097	3.030400298	No caracterizado
------------	-------------	------------------

ANEXO IX. GED en células no infectadas con respecto a las infectadas con ZIKV compartidos entre Ferreira P. et al. (2020) y el ensayo de RNA-Seq del presente trabajo.

Symbols	Gene Description	FC Ferreira P. et al. (2020)	FC este trabajo
LOC110674732	uncharacterized	0,678924097	54,07543229
LOC110675493	60S ribosomal protein L28	1,313553172	0,7904965885
LOC110676861	collagen alpha-1(IV) chain	1,773076245	1,380702146
LOC5563960	eukaryotic translation initiation factor 4H isoform X1	0,694174882	3,268887692
LOC5564053	protein stunted	1,453846063	0,4544645372
LOC5564518	microtubule-associated protein Jupiter isoform X4	1,506545735	1,771332129
LOC5564931	40S ribosomal protein S21	1,426736564	0,7202777512
LOC5565301	protein BTG1	0,827141463	1,692777976
LOC5565409	innexin inx2	0,71499853	1,398620856

LOC5565922	NF-kappa-B inhibitor cactus isoform X1	0,797023833	2,978516429
LOC5565962	60S ribosomal protein L30	1,280928387	0,8229624126
LOC5566385	zinc finger protein 585A isoform X1	0,786944959	1,707261316
LOC5566678	YTH domain-containing family protein 3 isoform X1	0,731985421	1,766037821
LOC5567559	histone H3,3	0,810959774	1,532851206
LOC5567581	proteasome subunit beta type-3	1,226130566	0,6362092806
LOC5567587	uncharacterized protein LOC5567587	1,421477143	0,4948801109
LOC5568714	far upstream element-binding protein 1	0,80111166	1,334442914
LOC5569582	60S ribosomal protein L22	1,75216534	0,7647156884
LOC5569670	40S ribosomal protein S29	1,241792792	0,4691373388
LOC5569700	ras-related protein Rab-5B	0,835614776	1,460158497
LOC5569968	protein scylla isoform X1	0,822501299	2,498618781
LOC5570318	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C	0,820398829	1,725440549

LOC5571006	ATP-dependent RNA helicase DBP2	0,802581706	1,920436714
LOC5571120	muscleblind-like protein 2a isoform X6	1,401718978	2,915412423
LOC5571735	cytochrome c oxidase subunit 6C-2	1,779554139	0,6137620052
LOC5571927	60S ribosomal protein L39	1,9578442	0,7535290502
LOC5572753	cold shock domain-containing protein E1 isoform X1	0,66900428	1,791018204
LOC5573065	AN1-type zinc finger protein 6	0,810289665	1,834002824
LOC5573217	40S ribosomal protein S12	1,225871303	0,7687763242
LOC5573879	cytochrome b-c1 complex subunit 6 mitochondrial	1,630217902	0,6617592187
LOC5574376	uncharacterized protein LOC5574376	1,299654912	2,84642667
LOC5574526	actin-5C	0,826078243	1,162840101
LOC5574731	uncharacterized protein LOC5574731	0,825031267	1,677258494
LOC5575105	40S ribosomal protein S15	1,535632167	0,7794710682
LOC5575585	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 isoform X1	0,713124122	1,427907254
LOC5575681	uncharacterized protein LOC5575681	1,536297311	0,6585670532

LOC5575790	sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha isoform X2	0,606286956	1,286174811
LOC5575986	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial	0,79092731	1,460158497
LOC5576110	uncharacterized protein LOC5576110	0,786560585	1,898453657
LOC5576170	nucleoside diphosphate kinase	1,35956548	0,6613022495
LOC5578123	40S ribosomal protein S16	1,219135375	0,7392647527
LOC5578368	60S acidic ribosomal protein P1	1,240176622	0,7433613897
LOC5579111	eukaryotic translation initiation factor 5A	1,250151266	0,7059923579
LOC5579840	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 isoform X1	0,728981038	2,053052239
LOC5579851	sortilin-related receptor	0,77251283	1,711985177
LOC5572173*	mitochondrial import receptor subunit TOMM7 homolog	2,073625269	0,2884695652
LOC5571086*	putative salivary secreted peptide	2,299760059	0,6003437587

* GED encontrados exclusivamente cuando se compara la infección con la cepa 31N contra mock.

La fila resaltada en negritas es para distinguir los transcritos cuya expresión diferencial se evaluó independientemente en la infección con las tres cepas de ZIKV en el presente proyecto.